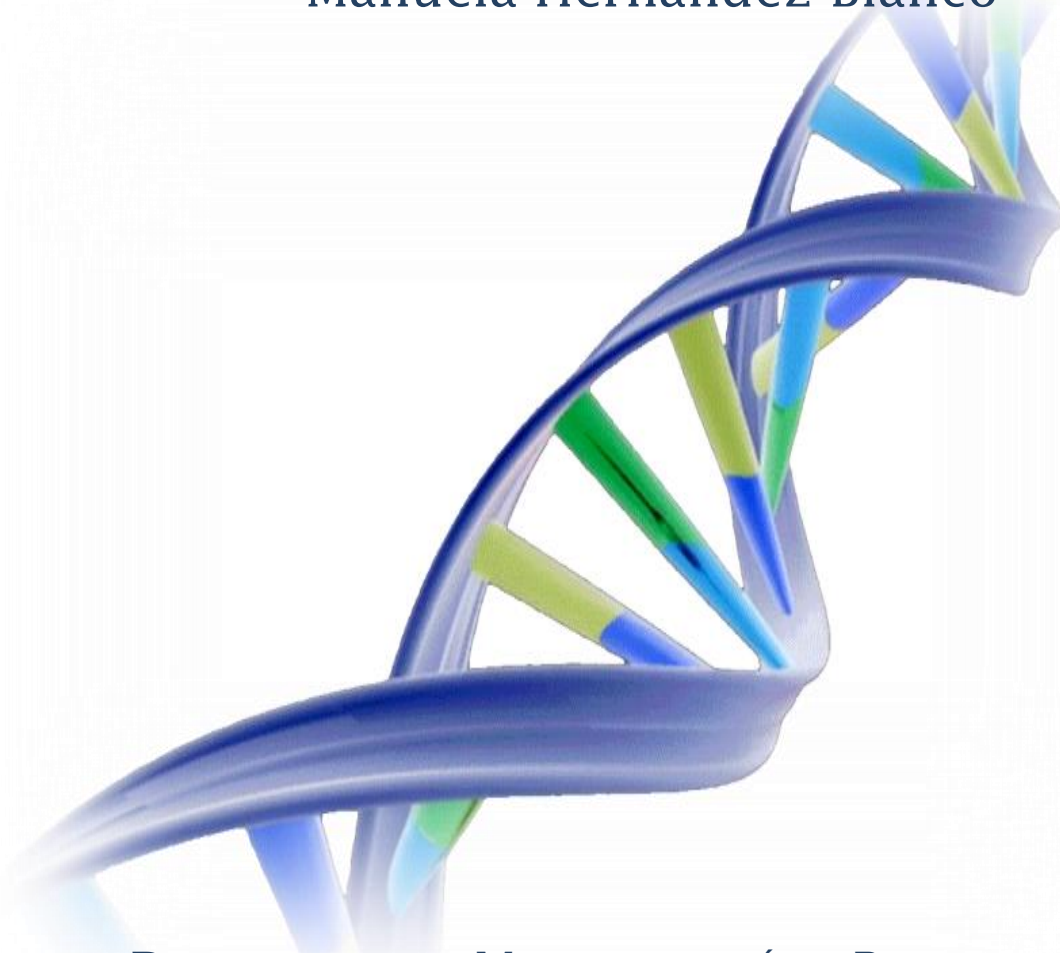


DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA SEPSIS

Manuela Hernández Blanco



DEPARTAMENTO MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTA DE MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2016





TESIS DOCTORAL

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA SEPSIS

Fdo. Manuela Hernández Blanco

DEPARTAMENTO MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2016



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

D. Benito Jose Regueiro García (Director)

Catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología Clínica

D. Julián Álvarez Escudero (Codirector)

Catedrático del Departamento de Cirugía

Dña. Alicia Estévez Tranzo (Tutora)

Catedrática del Departamento de Microbiología y Parasitología Clínica

Como Directores y Tutora de la Tesis de Doctorado titulada:

«DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA SEPSIS»

Presentada por Dña. Manuela Hernández Blanco

Alumno del Programa de Doctorado. Avances en Microbiología y Parasitología Clínica.

Autoriza a presentación da tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Director da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992.

Fdo. **D. Benito Jose Regueiro García**

Fdo. **D. Julián Álvarez Escudero**

Fdo. **Dña. Alicia Estévez Toranzo**



Agradecimientos

Este trabajo está dedicado nuestro compañero **Dr. Eduardo Varela** al que deseo dar las gracias por el valioso trabajo realizado. Su sabiduría creó escuela de la que todos nos hemos beneficiado y su grandeza como persona nos dio una lección de vida. Espero que desde donde quiera que esté se sienta orgulloso de los resultados.

Es un privilegio contar con profesionales en los que el trabajo diario se convierte en un aprendizaje continuo. Mi más sincero agradecimiento a las personas que me han brindado su ayuda, mención especial a:

Dr. Benito Regueiro director del proyecto por tener la deferencia de aceptarme bajo su dirección.

Dr. Julián Álvarez Escudero codirector de la tesis por su valiosa gestión en la coordinación con las unidades de críticos.

Dr. Ángel Fernández responsable de facilitar los datos de Cirugía Cardíaca.

Dra. Alicia Estévez Tranzo por su disponibilidad para ejercer como tutora.

D. Antonio Gómez Tato por la realización del programa estadístico.

D. Arturo Soto Fernández por la revisión del texto.

A todos mis compañeros de Microbiología y equipo de investigación de del CHUS

A mi familia y amigos porque sufren como nadie las consecuencias de mis actos, con un enorme abrazo para mi hijo Manuel por el tiempo le ha restado la realización de este trabajo.



A nuestro entrañable Edu



RESUMEN

La sepsis es una enfermedad emergente tiempo dependiente. El retraso en el diagnóstico y tratamiento aumenta de forma considerable la mortalidad. El manejo de la sepsis es uno de los retos más importantes de la medicina intensiva y probablemente ninguna otra entidad pone tan a prueba la pericia del clínico en el diagnóstico de la infección. Las técnicas de biología molecular constituyen una poderosa herramienta para el diagnóstico microbiológico precoz, pero sin embargo su aplicación resulta muy difícil de adaptar a cuadros de etiología tan compleja.

Se ha evaluado la técnica de diagnóstico molecular *SeptiFast* (ROCHE) *kit* en el diagnóstico de la sepsis, con el objetivo de diseñar un método de extracción automatizado basado en nanopartículas magnéticas que sustituya al manual, lo que ha supuesto una revolución metodológica. La repercusión directa va más allá del beneficio clínico; al acortar el intervalo de respuesta diagnóstica, permite adecuar la terapia empírica de forma precoz, descendiendo la mortalidad, la estancia hospitalaria y los costes sanitarios.

PALABRAS CLAVE

Sepsis, diagnóstico molecular, *SeptiFast*, extracción automatizada, nanopartículas magnéticas.



RESUMO

A sepsé é unha enfermidade emerxente tempo dependente, a dilación na diagnose e tratamento incrementa de forma considerable a mortalidade. O manexo da sepsé é un dos desafíos máis relevantes da medicina intensiva e probablemente ningunha outra entidade pon tan a proba a pericia do clínico na diagnose da infección. As técnicas de bioloxía molecular constitúen unha poderosa ferramenta para a diagnose microbiolóxica precoz, pero con todo a súa aplicación resulta moi difícil de adaptar a cadros de etioloxía tan complexa.

Avaliouse a técnica de diagnose molecular SeptiFast (ROCHE) *kit* na diagnose da sepsé, co obxectivo de deseñar un método de extracción automatizado baseado en nanopartículas magnéticas que substitúa á manual, o que supuxo unha revolución metodolóxica. A repercusión directa vai máis aló do beneficio clínico; ao acurtar o intervalo de resposta diagnóstica, permite acomodar a terapia empírica de forma precoz, diminúe a mortalidade, a estancia hospitalaria e os custos sanitarios.

PALABRAS CHAVE

Sepsé, diagnose molecular, SeptiFast, extracción automatizada, nanopartículas magnéticas.



SUMMARY

Sepsis is a time dependent emerging disease. The delay in diagnosis and treatment significantly increases mortality. The management of sepsis is one of the most important challenges of intensive care and probably no other entity gets the clinical expertise so tested in the diagnosis of the infection. The molecular biology techniques are a powerful tool for early microbiological diagnosis, yet its application is very difficult to adapt to such complex aetiology symptoms.

Molecular diagnostic technique *SeptiFast* (ROCHE) *kit* for the diagnosis of sepsis have been assessed with the goal of designing an automated extraction method based on magnetic nanoparticles to replace the manual one, which has meant a methodological revolution. The direct impact goes beyond the clinical benefit; by shortening the diagnostic interval response, it can adapt empiric therapy early, and decreases mortality, hospital stay and healthcare costs.

KEY WORDS

Sepsis, molecular diagnostic, *SeptiFast*, automated extraction, magnetic nanoparticles.



ÍNDICE

1.-INTRODUCCIÓN.....	21
1.1 Historia de la sepsis	23
1.2 Definiciones relacionadas con sepsis .Concepto	24
1.2.1 Definiciones	25
1.2.2 Criterios diagnósticos.....	26
1.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	28
1.3.1 Incidencia y mortalidad.....	28
1.3.2 Factores de riesgo	29
1.3.2.1 Factores poblacionales.....	30
1.3.2.2 Factores ambientales.....	31
1.3.2.3 Factores socioeconómicos	31
1.3.3 Evolución cronológica de los microorganismos y lugar de la infección.	32
1.4 FISIOPATOLOGÍA	34
1.4.1 Respuesta de huésped	34
1.4.2 Patogénesis de la sepsis	36
1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	39
1.5.1 Manifestaciones clínicas de sepsis incipiente	40
1.5.2 Manifestaciones clínicas de disfunción de organica aguda.	40
1.6 DIAGNÓSTICO	41
1.6.1 Historia clínica	42
1.6.2 Exploración física	42
1.6.3 Diagnóstico de laboratorio	43
1.6.3.1 Hematología.....	44
1.6.3.2 Bioquímica.....	44
1.6.4 Diagnóstico microbiológico.....	44
1.6.4.1 Elección de pruebas dignósticas según sospecha clínica.....	45
1.6.4.2 Hemocultivo	45
1.6.4.3 Pruebas serológicas	46
1.6.4.4 Diagnóstico molecular de la sepsis.....	47
1.6.5 Diagnóstico por imagen	48
1.6.6 Diagnóstico diferencial	48

1.7	TRATAMIENTO	48
1.7.1	Abordaje terapéutico de la sepsis	48
1.7.2	Administración de fluidos	49
1.7.3	Vasopresores	49
1.7.4	Tratamiento de la infección	50
1.7.5	Otras medidas terapéuticas	50
1.7.5.1	Corticoides	50
1.7.5.2	Control de glucemia	51
1.7.5.3	Asistencia respiratoria mecánica (ARM) protectora	51
1.7.5.4	Nuevas estrategias	51
2.-	OBJETIVOS	53
2.1	Objetivo principal	55
2.2	Objetivos específicos	55
3.-	MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1	Criterios clínicos de selección de pacientes y periodo de estudio	59
3.1.1	Primer grupo: Grupo observacional.	59
3.1.2	Segundo grupo: Grupo intervencionista.	60
3.1.3	Tercer grupo control para valoración del nuevo método de extracción automatizado.	60
3.1.4	Cuarto grupo pacientes seleccionados estudio endocarditis	60
3.2	Muestras y técnicas microbilógicas convencionales de diagnóstico	61
3.2.1	Hemocultivos	61
3.2.2	Estudios de microbiología convencional	61
3.2.3	Procesamiento e identificación de los microorganismos por métodos fenotípicos:	61
3.2.4	Diagnóstico molecular: Multiplex SeptiFast®	61
3.2.5	Extracción de ADN	62
3.2.5.1	Protocolo extracción del ADN bacteriano por el método SeptiFast Prep Kit:	63
3.2.5.2	Diseño de método automatizado: Extracción del ADN bacteriano por el método MagNA Pure Compact	63
3.2.6	PCR en tiempo real	64
3.2.6.1	Amplificación por PCR y detección a tiempo real en el sistema LightCycler® 2.0:	66
3.3	Comparación del sistema Septifast Prep Kit y el sistema MagNA Pure Compact en la preparación de ADN:	70
3.3.1	Primer control: recuperación de ADN genómico E.coli	71

3.3.2 Segundo control: recuperación de ADN genómico de cepas referencia ATTC	71
3.3.2.1 Recuperación de ADN en bacterias completas en buffer TE pH 8.....	72
3.3.2.2 Ensayo de SeptiFast para comprobar la capacidad de detectar el ADN de las 20 cepas de referencia en sangre con EDTA de donante sano.	73
3.3.3 Calculo control interno	74
3.4 Estudio de interferencia del ADN genómico con la extracción de ADN bacteriano mediante MagNA Pure Compact	74
3.4.1 Mezcla de ADN estándar E.coli con ADN placenta.....	74
3.4.2 Mezcla de ADN estándar E.coli en sangre total con recuento periférico de leucocitos normal.	75
3.4.3 Evaluación clínica de los dos métodos de extracción de ADN	76
3.5 Análisis estadístico:	78
3.6 Determinación del polimorfismo C-159-T en el promotor del gen del receptor CD14.....	78
3.6.1 Amplificación a partir de ADN genómico y análisis de restricción	79
3.6.2 PCR en tiempo real y <i>melting peaks</i> para determinación el SNP	80
3.7 Diagnóstico de endocarditis infecciosa a partir de tejido valvular	81
3.7.1 Extracción de ADN de vegetaciones de válvulas cardíacas con el sistema automático MagNA Pure Compact	82
4.-RESULTADOS.....	83
4.1 Análisis comparativo del rendimiento de SeptiFast (ROCHE) con los procesos de diagnóstico habitual utilizados en el laboratorio de microbiología.	85
4.1.1 Comparacion del SeptiFast con el Hemocultivo.....	85
4.1.2 Comparación de los resultados de SeptiFast con los obtenidos por el conjunto de procesamientos microbiológicos convencionales	89
4.2 Modificación de la técnica de extracción de ácidos nucleicos de sangre periférica para PCR LightCycler - SeptiFast	90
4.2.1 Rendimiento de las dos técnicas para recuperación de ADN control.....	91
4.3 Estudio de Interferencia del ADN genómico en la extracción de ADN bacteriano con MagNA Pure Compact	95
4.3.1 Mezcla de ADN de placenta con ADN de <i>E. coli</i>	95
4.3.2 Interferencia de sangre total (10.710 leucocitos/ μ l) con ADN de <i>E coli</i>	96
4.3.3 Evaluación clínica de los dos métodos extracción.....	97
4.4 Beneficio terapéutico del diagnóstico molecular.....	102

4.5 Rendimiento económico de Septi <i>Fast</i> en pacientes con sepsis. Estimación de costes. Consumo de recursos.....	113
4.6 Polimorfismo C-159-T del promotor de CD14	115
4.7 Diagnóstico de infección polimicrobiana mediante la PCR LightCycler-Septi <i>Fast</i>	118
4.8 Diagnóstico de Aspergilosis invasiva mediante PCR LightCycler Septi <i>Fast</i>	120
4.9 Diagnóstico de endocarditis infecciosa mediante PCR LightCycler Septi <i>Fast</i> en muestras de tejido valvular.....	123
6.-DISCUSIÓN.....	125
6.1 Modificación de la técnica de extracción de ADN	130
6.2 Beneficio terapéutico con el diagnóstico molecular	135
6.3 Rendimiento económico de Septi <i>Fast</i> en pacientes con sepsis. Estimación de costes. Consumo de recursos.....	138
6.4 Posible influencia del polimorfismo C-159-T en el promotor de CD14 en nuestro medio sobre la mortalidad	139
6.5 Diagnóstico de la infección polimicrobiana.....	140
6.6 Diagnóstico molecular de Aspergilosis invasiva	142
6.7 Diagnóstico molecular de Endocarditis infecciosa	143
6.8 Aplicaciones específicas en las que la PCR pudiera aportar un mejor apoyo en el diagnóstico de la sepsis.	145
7. CONCLUSIONES.....	147
7.1 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.....	149
7.2 CONCLUSION GENERAL. RESUMEN FINAL	151
8.- BIBLIOGRAFÍA	153

1.-INTRODUCCIÓN



Las infecciones graves en los pacientes de las unidades de cuidados intensivos (UCI) se asocian a una elevada morbilidad y mortalidad, sobre todo cuando su diagnóstico y tratamiento se retrasan más allá de las primeras 6 horas después del ingreso en la UCI¹. Esta rápida evolución de algunos cuadros clínicos obliga al laboratorio a mantener un contacto inmediato con estas unidades, avanzando cualquier hipótesis diagnóstica antes de que se pueda emitir un informe definitivo. Las limitaciones de algunos métodos tradicionales, que requieren de la viabilidad y del desarrollo de los microorganismos, siguen condicionando el inicio de terapias empíricas para mejorar el pronóstico de estos cuadros, que no admiten una respuesta microbiológica dilatada.

Las modernas técnicas de biología molecular, utilizadas ampliamente con éxito durante los últimos años, constituyen una poderosa herramienta para acelerar los diagnósticos microbiológicos, pero su aplicación resulta muy difícil de adaptar a cuadros de etiología tan compleja como la sepsis. La elaboración de un método molecular para el diagnóstico de bacteriemia como causa de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, que comprenda un espectro lo más amplio posible o que ayude a descartarla en pocas horas, era uno de los retos pendientes hasta las recientes fechas en que se comenzó a introducir **SeptiFast** (ROCHE) en un reducido número de laboratorios, entre los que se encuentra el nuestro, donde hemos podido evaluar su aportación al diagnóstico precoz de la sepsis.

1.1 Historia de la sepsis

Las enfermedades infecciosas han sido la mayor amenaza contra la salud a lo largo de la historia de la humanidad, y aún hoy en día representan la causa de más impacto en la patología del hombre moderno. Los microorganismos responsables de ellas poseen una enorme capacidad de adaptación a los cambios medioambientales como resultado de millones de años de evolución, y muchos de ellos conviven con nosotros desarrollándose en los tejidos que están en contacto con el “medio externo”. La infección tiene lugar cuando alguno de estos microorganismos o sus constituyentes superan el aislamiento interior, desencadenando una respuesta inmune que intentará eliminar la invasión, reparar el daño local causado, y evitar su progresión al resto del organismo.²

Desde los más antiguos tratados sobre Medicina, tenemos constancia del temor que suscitaba en nuestros antepasados la posible extensión generalizada de una infección, y de algunas de las medidas o precauciones que se tomaban para evitar este riesgo de tan extrema gravedad. Así en el “papiro Ebers”, compuesto en escritura hierática egipcia hacia el año 1550 a.C., se advierte del peligro de hinchazones malolientes con mucho pus y aire en su interior, que si se inciden quirúrgicamente pueden extender su mal a todos los miembros del cuerpo, de modo que luego se asemejan al que fue afectado primero.

El concepto de sepsis data de los tiempos de Hipócrates. Los antiguos griegos la consideraban una descomposición biológica que ocurría dentro del cuerpo causada por unos “principios internos” capaces de provocar una peligrosa autointoxicación, resultante en una putrefacción maloliente.³ De aquí procede el significado etimológico del término sepsis: *σῆψ- σήπω* (gr. ‘pudrir’) más el sufijo *-σις σήψις* (pudrir-se) Sepsis es pues, sinónimo de putrefacción.

El concepto de “generación espontánea” perduró durante siglos, hasta que Louis Pasteur realizó su elegante experimento en 1859 demostrando que el proceso de putrefacción no tiene lugar sin la participación de organismos vivos⁴ y poco después, en la década de 1870, Robert Koch describió los agentes etiológicos de enfermedades como el ántrax, la tuberculosis o el cólera⁵ además de formular sus conocidos postulados sobre las enfermedades infecciosas.⁴

En nuestros tiempos, la definición de algunos conceptos clínicos relacionados con las enfermedades infecciosas todavía es objeto de debate, y aunque poseemos eficientes fármacos antimicrobianos, el manejo de la sepsis continúa siendo uno de los retos más importantes de la medicina intensiva, y probablemente ninguna otra entidad, requiere de habilidades médicas tan complejas como las necesarias para el satisfactorio tratamiento del shock séptico.⁶

1.2 Definiciones relacionadas con sepsis. Concepto

Dada la ambigüedad presentada por múltiples definiciones a lo largo de muchos años, en las conferencias de consenso del American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine (ACCM/SCCM) en 1991 con la intención de unificar criterios, se

proponen nuevas definiciones sobre la sepsis y los procesos relacionados.⁷ Estas sociedades por comité de expertos de ámbito internacional elaboran guías de actuación que integran dos partes: Definiciones, criterios diagnósticos y recomendaciones en el abordaje terapéutico de la sepsis. Las guías se revisan de forma periódica y el objetivo es que orientar al clínico sobre el manejo de la sepsis.⁸⁻¹⁰ Sumándose a esta iniciativa, las diversas sociedades medicas han elaborado protocolos de actuación de carácter nacional, adaptaciones de las guías internacionales y que pretenden difundir y facilitar el manejo de la sepsis en nuestros hospitales.^{11,12} No obstante, a pesar de los esfuerzos, hoy día estas definiciones continúan siendo inespecíficas y precisan de criterios diagnósticos para delimitarse y aunque no han sufrido muchas modificaciones, se han adaptado e incorporado algunos conceptos que sientan las bases de las actuaciones clínicas.

1.2.1 Definiciones

Infección: Presencia de microorganismos en un sitio normalmente estéril que por lo general se acompaña de una respuesta inflamatoria del huésped.

Bacteriemia: Se define como la presencia de bacterias viables en la sangre, confirmada mediante hemocultivos positivos.

Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS): Concepto incorporado en la conferencia celebrada 1992 para definir la respuesta del organismo frente a una amplia variedad de procesos, infecciosos o no, que actúan como una agresión inespecífica (infección sistémica, quemaduras, isquemia, politraumatismo, shock hemorrágico, pancreatitis, cirugía mayor, lesión autoinmune...) y que en realidad representa las manifestaciones clínicas de la respuesta inflamatoria generalizada ante dicha injuria.⁸

Sepsis: Se define como la presencia posible o documentada de una infección junto con las manifestaciones sistémicas de infección.

Sepsis grave: Sepsis sumada a disfunción orgánica inducida por sepsis o hipoperfusión tisular.

Hipoperfusión tisular inducida por sepsis: Hipotensión inducida por infección lactato elevado u oliguria.

Choque septicémico: Hipotensión inducida por sepsis que persiste a pesar de la reanimación adecuada con fluidos.

La presentación inicial de sepsis severa o shock séptico, es frecuentemente inespecífica y su severidad, críptica. Pacientes que ingresan con relativa benignidad o clínicamente sin infección aparente, pueden progresar en sólo unas pocas horas a estas formas mucho más avanzadas y graves de la enfermedad.

1.2.2 Criterios diagnósticos

Conjunto de síntomas signos, parámetros clínico-analíticos y biomarcadores que pretenden delimitar las definiciones de sepsis, orientar el diagnóstico y marcar el inicio de las actuaciones terapéuticas.

Estos criterios se han ampliado en las sucesivas revisiones, de especial relevancia la introducción en la conferencia consenso del 2001 de la procalcitonina y la proteína C reactiva como biomarcadores de sepsis estandarizados.⁹

No obstante, hay tener en cuenta que ningún criterio es patognomónico y que los criterios de SIRS son tan sensibles que el 90 % de los enfermos ingresados en cuidados críticos cumplen criterios de sepsis,^{13.14} por otro lado, si bien es verdad en la sepsis presenta infección, en una infección pueden estar presente varios criterios como fiebre, leucocitosis, taquipnea sin necesariamente se trate de una sepsis. No podemos olvidar pues, que los criterios diagnósticos son meramente orientativos, cada caso debe verse de manera individualizada y abordarse de manera multidisciplinar ya que en las fases iniciales, los factores clave en el diagnóstico de la sepsis, son el sentido común y la habilidad del clínico en el diagnóstico de la infección. Tablas 1.2.3¹⁰

TABLA 1. Criterios diagnósticos de SIRS

Dos o más de los siguientes criterios Temperatura > 38°C o < 36°C Frecuencia cardíaca > 90 latidos/min Frecuencia respiratoria > 20 respiraciones/min. ó PaCO ₂ < 32 mm Hg Recuento leucocitario > 120.000/mm ³ ó < 4.000/mm ³ o más de 10% de forma inmaduras
--

TABLA 2. Criterios para el diagnóstico o sepsis

Infección, documentada o sospechosa, y los siguientes factores:

Variables generales

Fiebre ($> 38,3^{\circ}\text{C}$)

Hipotermia (temperatura base $< 36^{\circ}\text{C}$)

Frecuencia cardíaca $> 90/\text{min}-1$ o más de dos sd por encima del valor normal según la edad

Taquipnea

Estado mental alterado

Edema importante o equilibrio positivo de fluidos ($> 20 \text{ mL/kg ml/kg}$ durante más de 24 h)

Edema importante o equilibrio positivo de fluidos ($> 20 \text{ mL/kg ml/kg}$ durante más de 24 h)

Hiper glucemia (glucosa en plasma $> 140 \text{ mg/dL}$ o $7,7 \text{ mmol/l}$) en ausencia de diabetes

Variables inflamatorias

Leucocitosis (recuento de glóbulos blancos $[\text{WBC}] > 12\,000 \mu\text{L}-1$)

Leucopenia (recuento de glóbulos blancos $[\text{WBC}] < 4\,000 \mu\text{L}-1$)

Recuento de WBC normal con más del 10% de formas inmaduras

Proteína C reactiva en plasma superior a dos sd por encima del valor normal

Procalcitonina en plasma superior a dos sd por encima del valor normal

Variables hemodinámicas

Presión arterial sistólica (PAS) $< 90 \text{ mm Hg}$, PAM $< 70 \text{ mm Hg}$ o una disminución de la PAS $> 40 \text{ mm Hg}$ en adultos o inferior a dos sd por debajo de lo normal según la edad

Variables de disfunción orgánica

Hipoxemia arterial ($\text{Pao}_2/\text{FIO}_2 < 300$)

Oliguria aguda (diuresis $< 0,5 \text{ ml/kg/h}$ durante al menos 2 horas a pesar de una adecuada reanimación con fluidos)

Aumento de creatinina $> 0,5 \text{ mg/dL}$ or $44,2 \mu\text{mol/L}$

Anomalías en la coagulación ($\text{RIN} > 1,5$ o $\text{aPTT} > 60 \text{ s}$)

Íleo (ausencia de borborismos)

Trombocitopenia (recuento de plaquetas $< 100\,000 \mu\text{L}-1$)

Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total en plasma $> 4 \text{ mg/dL}$ o $70 \mu\text{mol/L}$)

Variables de perfusión tisular

Hiperlactatemia ($> 1 \text{ mmol/L}$)

Reducción en llenado capilar o moteado

WBC = glóbulo blanco; PAS = presión arterial sistólica; PAM = presión arterial media; RIN = razón internacional normalizada; aPTT = tiempo de tromboplastina parcial activado.

Los criterios para el diagnóstico de sepsis en la población pediátrica son signos y síntomas de inflamación e infección con hipertermia o hipotermia (temperatura rectal $> 38,5^{\circ}$ o $< 35^{\circ}\text{C}$), taquicardia (puede no observarse en paciones hipotérmicos) y al menos alguna de las siguientes indicaciones de función orgánica alterada: estado mental alterado, hipoxemia, aumento del nivel de lactato en suero o pulso saltón.

Adaptación de Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003; 31: 1250-1256 (22)

TABLA 3 .Definición de sepsis grave = hipoperfusión tisular o disfunción orgánica inducida por sepsis (cualquiera de los siguientes casos debido a la infección)

Hipotensión inducida por sepsis

TABLA 2 SEPSIS GRAVE

Diuresis < 0,5 ml/kg/h durante más de 2 h a pesar de una reanimación adecuada con fluidos
 Lesión pulmonar aguda con $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 250$ con ausencia de neumonía como foco de infección
 Lesión pulmonar aguda con $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 200$ por neumonía como foco de infección
 Creatinina > 2,0 mg/dL (176,8 $\mu\text{mol/L}$)
 Bilirrubina > 2 mg/dL (34,2 $\mu\text{mol/L}$)
 Recuento de plaquetas < 100 000 μL
 Coagulopatía (razón internacional normalizada > 1.5)

Adaptación de Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS
 International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-1256.(22)

En definitiva la sepsis se define hoy día por consenso de expertos, son adaptaciones de las establecidas en las conferencias de 1991-1992, necesitan apoyarse en criterios diagnósticos para interpretarse y a pesar de los esfuerzos por lograr unanimidad, continúan sin convencer, en un simposio Merinoff, el Foro Internacional de Sepsis escribió "sepsis es una enfermedad potencialmente mortal que se presenta cuando la respuesta del cuerpo a una infección lesiona sus propios tejidos y órganos", esta es la última percepción de la sepsis,¹⁵ es posible que en un futuro próximo, los avances en el conocimiento de la sepsis nos permitan delimitar el concepto con claridad.

1.3 EPIDEMIOLOGÍA

1.3.1 Incidencia y mortalidad

La sepsis provoca la muerte de una persona cada pocos segundos. Se estima que a nivel mundial afecta entre 20 y 30 millones de pacientes al año, es la principal causa de muerte infantil. Afecta tanto a los países desarrollados como los países en vías de desarrollo aunque muestran notables diferencias, mientras que en el mundo desarrollado ha aumentado un 8%-13% anual, en las últimas décadas debido a la edad avanzada, incremento de los procesos invasivos e intervenciones quirúrgicas, pacientes con inmunodeficiencias severas. En los países en menos favorecidos, la malnutrición, la pobreza, escasez de medicamentos y vacunas son sus principales causas.¹⁶⁻¹⁷ En España afecta a 50.000 personas al año (104 casos por

100000 habitantes) de los cuales mueren 17000, provoca más muertes que el cáncer de mama y páncreas y trece veces superior a los fallecidos en accidentes de tráfico, lo que supone un incremento importante es los costes de salud.¹⁸

La sepsis es la principal causa de muerte en pacientes críticamente enfermos, con una tasa de mortalidad que asciende al 50%-80%. Aunque existe algún estudio reciente en países menos favorecidos en la mayoría de ellos carecemos de datos por lo que se estima que pudiera ser más elevada.¹⁹ En los países desarrollados prácticamente presentan tasas muy similares.²⁰ En EEUU el número de casos supera los 750000, la sepsis grave se registra en un 2% de las pacientes del hospital. De estos la mitad son tratados en la UCI que representa un 10% de los ingresos en UCI y parece estar aumentando.²¹⁻²²

Un estudio reciente en España en un periodo de 6 años del 2006-2011 se identificaron 240.939 casos de sepsis grave en todo el país que corresponde al 1% de las hospitalizaciones y el 54% de las hospitalizaciones con sepsis. La incidencia fue de 87casos por 100000 habitantes. El 58%de los casos eran hombres, el 66% eran mayores de 65 años y aproximadamente el 67% tenía comorbilidades asociadas. La bacteriemia fue codificada en el 16% de los registros. El 54% tenía una disfunción orgánica 26% dos y 20% tres o más. La tasa de letalidad fue del 43%, está relacionada con la edad avanzada y procesos de base. Los datos son similares a los de países desarrollados y coinciden en que, a pesar de que las tasa de mortalidad han ido en aumento, las tasa de letalidad están en descenso, probablemente por la mejora en cuidados sanitarios y número mayor de pacientes tratados en las unidades de críticos.²³

1.3.2 Factores de riesgo

Los factores de riesgo que aumentan la posibilidad de padecer una sepsis están relacionados con la probabilidad del individuo a desarrollar una infección ó fallo orgánico.

En general, aunque gran parte de los factores de riesgo son desconocidos o muy difíciles atribuir a una sola causa, la mayoría de los estudios coinciden en que ciertos rasgos propios al individuo o factores externos, pueden aumentar la incidencia.

1.3.2.1 Factores poblacionales

Existe gran variabilidad de factores poblacionales. Los ancianos, el sexo masculino, la raza negra presentan mayor incidencia de sepsis.²⁴ Los ancianos, tienen un sistema inmunológico más debilitado, sus órganos se encuentran más desgastados, suelen padecer enfermedades de base como cardiopatía, EPOC, diabetes y es posible que la gran mayoría haya sufrido varios ingresos hospitalarios ó habiten en residencias sociosanitarias que contribuyen a aumentar la incidencia de infección.²⁵

Los estudios étnicos parecen demostrar que el sexo masculino y la raza negra presentan mayor número de posibilidades de padecer una sepsis.²⁶ Una vez más, los estudios están sesgados, se encuentran supeditados a factores socioeconómicos, normalmente la raza negra suele vivir en zonas más desfavorecidas y son atendidos en hospitales con menos recursos.²⁷

Los factores poblacionales tambien están sujetos a muchas variables difíciles de medir en las que interfieren características genéticas propias de cada individuo. Se han descrito PG de la proteína ligadora de la endotoxina, receptor CD14, factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), TNF- α , interleucina 1 alfa (IL-1 α), IL-1 β IL-1, IL-6 e IL-10 que se asocian con mayor riesgo de padecer sepsis.²⁸⁻³¹

Ciertos factores relacionados con determinados grupos poblacionales, aumentan la posibilidad de padecer sepsis como pacientes con ingresos recientes, sometidos a procedimientos invasivos, portadores de prótesis, trasplantados, obesidad, adictos a drogas parenterales, prematuridad y enfermedades con el sistema inmunológico alterado como pueden ser el VIH, la diabetes o el cáncer.³²⁻³³

Las enfermedades malignas aumentan un 10% el riesgo de padecer septicemia de ellas el (8.7%) son enfermedades hematológicas, con mayor frecuencia el linfoma no Hodgkin, posiblemente debido al grado de mielosupresión al que se someten a estos pacientes durante la quimioterapia basal y el trasplante. Otros tumores sólidos como el cáncer de pulmón, la frecuencia de neumonía es mucho mayor, aunque afortunadamente, parecen estar disminuyendo por las mejoras el tratamiento inmunosupresor.³⁴

Otro grupo poblacional de riesgo son aquellos pacientes que han sufrido sepsis, está demostrado que la enfermedad crónica aumenta la incidencia de padecer una infección y la

sepsis empeoran la enfermedad crónica, con un mayor riesgo de sufrir una infección posiblemente por alteración del sistema inmunológico,³⁵⁻³⁶ como consecuencia, se genera un circuito cerrado de retroalimentación que empeora sustancialmente la calidad de vida de los pacientes.³⁷

1.3.2.2 Factores ambientales

Los estudios han analizado la influencia de la luz sobre sepsis, una menor exposición a la luz solar un mes antes del ingreso podría estar relacionada con una disminución de la mortalidad aunque de momento por ahora estos hallazgos no son concluyentes.³⁸

Los factores de riesgo climáticos, parecen estar más relacionados con los cambios estacionales y el predominio de los patógenos en un determinado clima. La sepsis es estacional, mucho más frecuente y con mayor letalidad en los meses de invierno, coincidiendo con la mayor incidencia de enfermedades respiratorias, la distribución geográfica también parece tener importancia. EEUU la incidencia fue mayor en las regiones del noroeste que en las del sur,³⁹ puede que estas variaciones estén sujetas a la variabilidad de patógenos según la latitud y el estado socioeconómico. Según un reciente estudio, los países más próximos a Ecuador tienen presentan mayor número de infecciones por bacilos Gram negativos que están asociados con una mayor mortalidad.⁴⁰

1.3.2.3 Factores socioeconómicos

El abordaje temprano de la sepsis, canalizando una vía administrando líquidos, vasopresores y antibioterapia esta en relación directa con la disminución de la mortalidad. Es muy importante que se inicie tratamiento desde principio por parte de las unidades medicalizadas antes de llegar al hospital.⁴¹ Otro punto importante, es el tiempo de espera en Urgencias, la sepsis es difícil de diagnosticar, si no existe un triaje adecuado o el tiempo de espera en Urgencias es prolongado, puede tener graves consecuencias en una enfermedad que el tiempo es vital.⁴² El número de camas de las unidades de críticos, en la mayoría de las poblaciones es escaso, se ha comprobado que la mortalidad de la sepsis es mayor cuando los pacientes son tratados fuera de las unidades de críticos.⁴³⁻⁴⁴ En España en el 2003 sólo el 32% de los paciente son sepsis grave, fueron tratados en UCI⁴⁵ en comparación con el 51,1% en los Estados Unidos. Se ha postulado que la alta incidencia de la sepsis en la UCI en países como

el Reino Unido (27,1%) y Brasil (27,3%), refleja una escasez de camas de UCI ya que sólo los pacientes más enfermos pueden ser admitidos. Hay 8,6 camas de UCI por 100.000 habitantes en el Reino Unido en comparación con el 38,4 y el 30,5 por 100 000 en Francia y en los Estados Unidos, en donde la frecuencia UCI media de la sepsis es de 12,4% y 12,6%.⁴⁶

El nivel socioeconómico influye de manera importante sobre la mortalidad, una educación avanzada, empleos bien remunerados y vivir en barrios con baja pobreza, tienen una mayor esperanza de vida y las comorbilidades más bajas.⁴⁷⁻⁴⁹ Las causas no son claras a nivel individual, puede que influyan factores inmunológicos.⁵⁰ La relación es directa en el caso de otros condicionantes, las personas nivel sociocultural alto, tienen acceso a un sistema sanitario con mejores condiciones, el vivir en zonas más desarrolladas, implica que los accesos a los hospitales estén conectados por autovías y helipuertos que acorta el tiempo de traslado al hospital. Son zonas dotadas de unidades medicalizadas con posibilidades de administrar tratamiento inicial, canalizar vías y administrar fluidos. Los hospitales son de referencia, con unidades de triaje en el servicio de Urgencias, que permiten una selección rápida. Una vez ingresados, cuentan con mayor nº de camas en unidades de críticos dotados de pruebas específicas y con profesionales de todas las especialidades de guardia las 24 horas que permiten efectuar una intervención inmediata de manera multidisciplinar, circunstancias clave, en el diagnóstico y tratamiento de la sepsis.

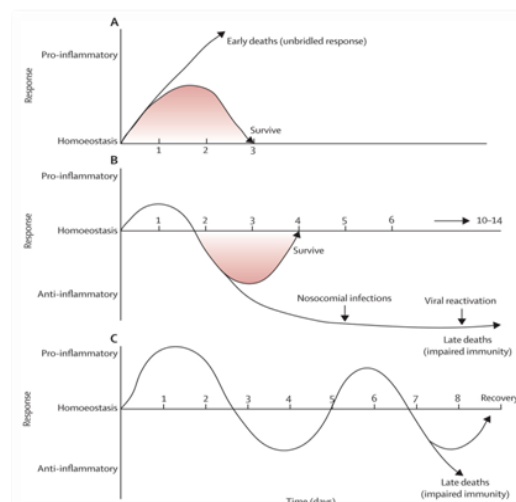
1.3.3 Evolución cronológica de los microorganismos y lugar de la infección.

Los microorganismos evolucionan a lo largo de los años de forma paralela a la raza humana o es posible, que la evolución de la raza humana condicione la evolución de los patógenos. El desarrollo de la medicina, ha dado lugar a que se realicen mayor número de intervenciones quirúrgicas de alto riesgo antes impensables, la colocación de dispositivos va en aumento y el empleo de antibióticos de amplio espectro ha supuesto la aparición de microorganismos multiresistentes por presión antibiótica.

Una adecuada evaluación clínica del paciente con bacteriemia, debe plantear una serie de cuestiones clave que nos permitan anticipar su orientación diagnóstica.⁵¹ Estas averiguaciones junto con el conocimiento de la epidemiología local, permitirán establecer un juicio clínico, incluida la etiología más probable e iniciar el tratamiento de forma más adecuada.

La localización y el tipo de microorganismo es variable, dependiendo si se trata de una infección comunitaria, asociada a cuidados sociosanitarios ó nosocomial. Se considera infección comunitaria, la que se detectada dentro de las primeras 48 horas de hospitalización, no mediando durante ese periodo ninguna actividad asistencial que pueda haberla inducido. Las infecciones asociadas a cuidados sanitarios son las secundarias a procedimientos diagnósticos o terapéuticos

realizados de forma ambulatoria, las de pacientes ambulatorios portadores de sondas o catéteres intravenosos, las de pacientes en hemodiálisis crónica y en diálisis peritoneal y las bacteriemias de pacientes ingresados en residencias de ancianos y en centros de larga estancia. Las infecciones nosocomiales, son la adquiridas en el hospital, excluyendo aquellas que se detectan en las primeras 48 horas, cuando ninguna acción sobre el paciente, haya podido inducirla después del ingreso.⁵²⁻⁵³



[Lancet Infect Dis. 2013 Mar; 13 \(3\): 260-268](#)

Alrededor de un tercio de los pacientes ingresados en centros de tercer nivel, presentan en el momento de su ingreso o desarrollan durante su estancia en el hospital un SRIS, y dicha prevalencia supera el 50%, en aquellos que requieren atención en unidades de cuidados intensivos (UCI), de estos pacientes críticos, aproximadamente, un 25% sufrirá un episodio de sepsis. Hasta hace poco la localización más frecuente era la infección urinaria en la actualidad, se considera la más frecuente la infección respiratoria, principalmente la neumonía, que presenta mayor mortalidad.⁵⁴ Prevalencia Europea de Infección en Cuidados Intensivos estudio EPIC (II) informó más organismos gram-negativas (62,2% vs. 46,8%). Los patrones de microorganismos infecciosos, son similares a los de estudios previos. Los microorganismos predominantes son *S.aureus* (20,5%), *Pseudomonas* (19,9%), *Enterobacteriaceae* (principalmente *E.coli*, 16,0%), y hongos (19%). *Acinetobacter* estaba involucrado en 9% de todas las infecciones, con una variación significativa de las tasas de infección, en las diferentes regiones (3,7% en América del Norte vs. 19,2% en Asia).

Estos datos, se correlacionan con el estudio de prevalencia de infección nosocomial en España EPINE. En la infección comunitaria, un 36.56% son enterobacterias, el 8.69% de BGN no fermentadores, frente a un 28.19% de cocos Gram positivos, 3.64% levaduras, 3.04% de anaerobios y 11.79% víricas. En la infección nosocomial, las enterobacterias prácticamente es el mismo porcentaje, suponen un 35.5%, con aumento significativo de los BGN no fermentadores que suponen un 15.07%, los cocos Gram positivos el 35.15%, las levaduras en un 8.19%, disminuye el porcentaje de enfermedades virales al 0.42%. En la infección nosocomial los patógenos más frecuentes es *Escherichia coli* en un 15.17% seguido de *Pseudomona auruginosa* que supone el 11.18%.⁵⁵⁻⁵⁶

En la epidemiología de la sepsis intervienen múltiples factores: poblacionales, medioambientales, socioeconómicos y culturales. La localización y los microorganismos también es variable, esta situación, implica establecer un marcaje estrecho a los microorganismos, ya que el conocimiento exhaustivo de la epidemiología de forma global en todas sus facetas: periódica, estacional, regional, local, intrahospitalaria y en las diferentes unidades médicas y por supuesto prestando especial atención a las posibles epidemias y brotes nosocomiales que puedan surgir, es de vital importancia porque condiciona sobremanera el tratamiento empírico.

1.4 FISIOPATOLOGÍA

Hoy día la causa principal de la sepsis continua siendo desconocida. La mayor parte de los experimentos se han realizado en ratones y aún nos encontramos en fase de descripción fenomenológica.⁵⁷⁻⁵⁸ El fracaso de ensayos clínicos de alto perfil ha llevado a los investigadores a afirmar que se los estudios de sepsis necesitan una nueva dirección.⁵⁹

1.4.1 Respuesta de huésped

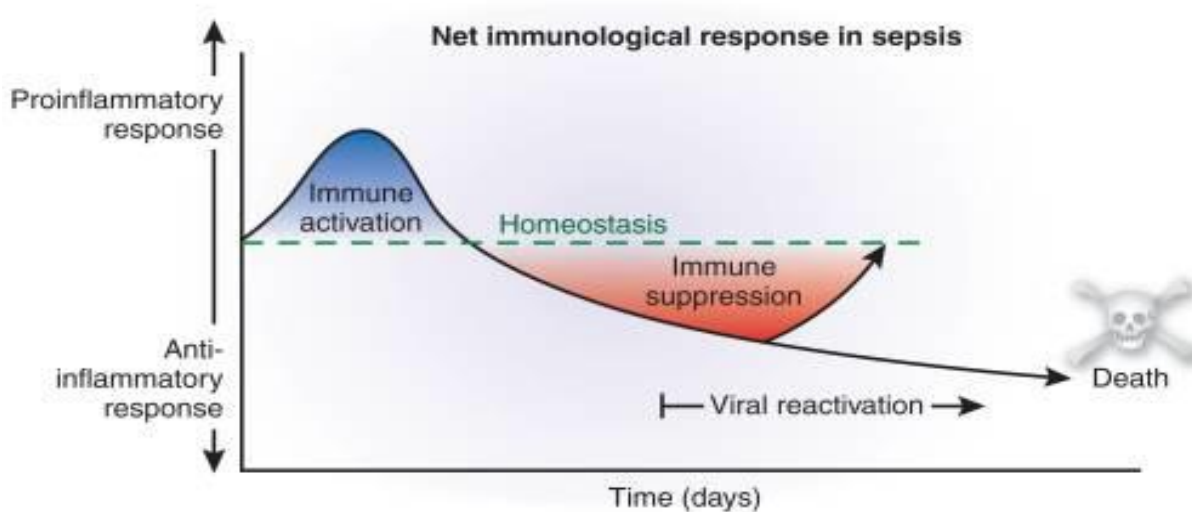
Recientes investigaciones y la evidencia de que algunos pacientes sobreviven a la fase hiperinflamatoria de la sepsis y desarrollaron un estado antiinflamatorio retardado y prolongado, definido inicialmente como **CARS**, a desechado la teoría que la sepsis estaba producida por una tormenta de citocinas.⁶⁰ Después de un considerable debate, se acordó por consenso que la sepsis puede evolucionar en dos fases: la primera es la hiperinflamación

(tormenta de citoquinas) y el segundo ser hipo-inflamación (parálisis inmune).⁶¹ La intensidad de la fase inicial hiperinflamatoria, es más habitual en pacientes jóvenes con el sistema inmune intacto, y depende de múltiples factores subyacentes: estado físico y comorbilidades del paciente, factores de virulencia de los patógenos, la carga de patógenos y factores genéticos.

Las nuevas terapias y protocolos de tratamiento, han dado lugar a una enfermedad más prolongada, con un cambio hacia la fase de inmunosupresión, la sepsis es cada vez más una enfermedad de personas mayores, en los países avanzados, suponen el 60% de los pacientes con una tasa mortalidad del 75%. La disfunción inmune, conduce a una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas secundarias (neumonía asociada a ventilación mecánica [NAV] ⁶² infecciones con organismos normalmente no virulentos u oportunistas, reactivación latente de virus herpes (citomegalovirus [CMV]) , ⁶³⁻⁶⁴ un mayor riesgo de MODS y pérdida de respuesta retardada tipo hipersensibilidad a antígenos de recuerdo común. La investigación realizada por muchos grupos, ha demostrado que hipo-inflamación se debe a una variedad de defectos inmunes incluyendo una respuesta inmune adaptativa disfuncional. ⁶⁵

Una tercera respuesta inmunológica teórica a la sepsis, se caracteriza por un ciclo entre hiperinflamatoria y estados hipoinflamatoria. Según esta teoría, los pacientes que desarrollan sepsis, tienen una respuesta hiperinflamatoria inicial seguida de un estado hipoinflamatorio y con el desarrollo de una nueva infección secundaria, los pacientes tienen una respuesta hiperinflamatoria repetición y pueden o bien recuperar o volver a entrar en la fase hipoinflamación. Los pacientes pueden morir en cualquier estado. Hay menos evidencia de esta teoría pero parece ser que cuanto más se prolongue la sepsis, existe un mayor riesgo de desarrollar una profunda inmunosupresión. ⁶⁶

Las primeras muertes durante la fase de respuesta proinflamatoria principalmente se deben a eventos de tormenta mediada por citoquinas, mientras que las muertes posteriores durante la fase anti-inflamatoria se deben a la falta de control de los patógenos. Normalmente en la sepsis temprana, predomina la respuesta proinflamatoria, cuando la sepsis avanza predomina la respuesta anti-inflamatoria y es durante esta fase cuando se producen infecciones secundarias y la reactivación viral. ⁶⁵



1.4.2 Patogénesis de la sepsis

La patogénesis de la sepsis es pues, el resultado de un complejo entramado de eventos cuyo desencadenante inicial, es la exposición al sistema inmunitario de diversos componentes bacterianos, que al ser reconocidos, inducen una respuesta inflamatoria descontrolada. Receptores activados del sistema inmune innato receptores de reconocimiento de patrones, (PRRS), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daños (apaga), incluyendo proteínas intracelulares asociada a tejido lesionado (alarmins), conducen a una respuesta imune exagerada. Este se caracteriza por una compleja interacción de citocinas, quimiocinas, complemento y factores de coagulación, así como células reguladoras inflamatorias e inmunes.⁶⁷⁻⁶⁹ Además, los mecanismos neuronales pueden inhibir la inflamación. En el llamado reflejo neuroinflamatorio, la entrada sensorial se retransmite a través del nervio vago aferente hacia el tronco cerebral, posteriormente el nervio vago eferente, en el plexo celiaco, activa el nervio esplénico que libera en el bazo norepinefrina y en un subconjunto de células T CD4 + acetilcolina. La liberación de acetilcolina se dirige a los receptores colinérgicos $\alpha 7$ sobre los macrófagos, que origina a la supresión de la liberación de citoquinas proinflamatorias.⁷⁰⁻⁷²

El endotelio es el blanco principal de los eventos inducidos en la sepsis y la cantidad de daño de sus células explica la patología del choque séptico. La manifestación hemodinámica más grave de la sepsis es el choque hiperdinámico, caracterizado por un

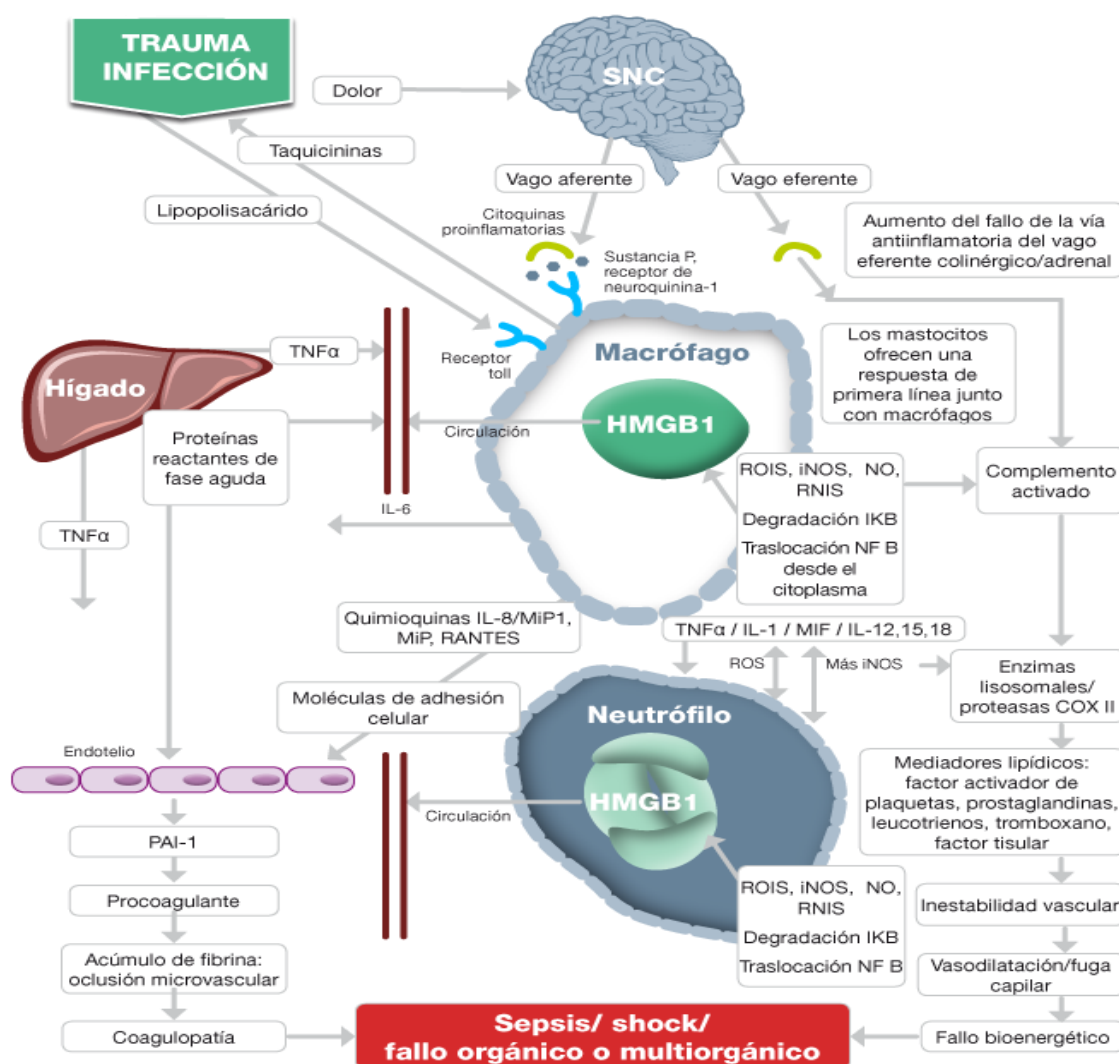
incremento del gasto cardíaco y una pérdida de la resistencia vascular periférica, acompañados, de una mala distribución del flujo sanguíneo en la microcirculación, en consecuencia a un deterioro de la oxigenación. La hipoperfusión, es un hallazgo común, aun en presencia de gasto cardíaco normal o aumentado, y está estrechamente relacionada con la disfunción de múltiples órganos y sistemas que caracteriza a la sepsis grave. La coagulación intravascular diseminada (CID), es frecuente en los pacientes sépticos, y se caracteriza por un depósito de fibrina y microtrombos que ocluyen la microcirculación, y están asociadas con el empeoramiento del cuadro clínico. Hay un creciente reconocimiento, de que el evento fisiopatológico importante en la sepsis, es la progresión del estado hiperinflamatoria inicial a un estado de inmunosupresión, en el que el huésped, es incapaz de erradicar los patógenos invasores y son particularmente propensos a desarrollar infecciones. Se caracteriza, por un incremento del gasto cardíaco y una pérdida de la resistencia vascular periférica, acompañados, de una mala distribución del flujo sanguíneo en la microcirculación, en consecuencia, un deterioro de la oxigenación.

Durante varios años, la activación de la coagulación ha sido considerada únicamente como un mecanismo de daño tisular, un concepto que llevó a efectuar varios ensayos clínicos con agentes anticoagulantes para la sepsis. Recientemente, este paradigma ha sido cuestionado por el fracaso de los ensayos clínicos, y mayor crecimiento evidencia, que el concepto de que la activación de la coagulación es beneficioso para la eliminación de patógenos.⁷³

El retiro de mercado de la proteína C activada, recombinante (rhAPC), un anticoagulante natural que se utiliza en el tratamiento de la sepsis, representa el último capítulo de una historia caracterizada por fallos en serie de ensayos clínicos a gran escala, diseñados para poner a prueba la hipótesis generalmente aceptada de que la activación de la coagulación y trombosis microvascular fueron los principales determinantes de daño tisular en la sepsis.⁷⁴

La coagulación y la inmunidad innata han evolucionado paralelamente durante 450 millones de años.⁷⁵ La sepsis, una de las causas más importantes del mundo de muerte, es probablemente la condición en la que este vínculo evolutivo es más evidente. Durante la sepsis, la respuesta del huésped a un patógeno se asocia invariablemente con la activación de la coagulación. El reconocimiento de los patógenos invasores por la inmunidad innata

desencadena mecanismos que contribuyen a la remoción de patógenos tales como la activación endotelial y el reclutamiento de células inmunes a los sitios de infección. Activación de la coagulación es parte de esta respuesta estereotipada. Durante la sepsis, el aumento de la expresión del factor tisular, la baja regulación de las vías de anticoagulantes naturales, y el resultado hipo fibrinólisis en una mayor generación de trombina y la formación de coágulos. Las consecuencias positivas de activación de la coagulación incluyen la liberación de péptidos antimicrobianos de la proteólisis de varias proteínas de la cascada de coagulación, y la limitación de patógenos difundida por la fibrina medida hemostática de contención. Sin embargo, la activación de la coagulación desregulada también podría contribuir a la trombosis microvascular y la hipoxia, lo que contribuye al daño tisular en la sepsis. La identificación precisa del momento en que la activación de la coagulación convierte de beneficioso un proceso perjudicial, permitiría aproximaciones terapéuticas más racionales para la sepsis.⁷⁵⁻⁷⁷



1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de sepsis son muy variables dependiendo del sitio inicial de la infección, el organismo causante, el patrón de la disfunción orgánica aguda, el estado de salud subyacente del paciente y el intervalo antes de la inicio del tratamiento. Los signos de infección y disfunción de órganos pueden ser sutiles, y por lo tanto las más recientes directrices de consenso internacional proporcionan una larga lista de señales de advertencia de la sepsis incipiente.⁷⁸⁻⁸⁸

1.5.1 Manifestaciones clínicas de sepsis incipiente

La clínica de la sepsis de inicio puede ser larvada e insidiosa, es frecuente que se pase por alto la verdadera dimensión de cuadro clínico. Ciertos síntomas nos pueden poner bajo la sospecha de que el paciente esté iniciando o ya esté instaurado un cuadro séptico:

La **fiebre** es una de los síntomas más comunes, pero puede estar ausente si el paciente está a tratamiento con antiinflamatorios, antitérmicos, es de edad avanzada, inmunodeprimido o tiene insuficiencia renal. Con menos frecuencia, presenta hipotermia, que suele ser un signo de mal pronóstico.⁸⁹⁻⁹² La **hiperventilación** es frecuente y suele aparecer en las fases tempranas de la sepsis cuando aún no han aparecido otras manifestaciones clínicas, por lo que puede confundirse con cuadro de ansiedad. La **hipotensión**, sobre todo si está asociada a **un lactato elevado**, debe alertarnos que nos encontramos ante un Shock séptico.⁹³ Pueden presentar **confusión y alteración del nivel de conciencia** que se produce con mayor frecuencia en ancianos y enfermos neurológicos.⁹⁴ En ocasiones, la morfología de las **lesiones cutáneas** sugiere la etiología de la infección desencadenante de la sepsis. Las petequias y la púrpura son frecuentes en los pacientes con sepsis.^{95-97b} Pueden presentar otra sintomatología que va depender de las manifestaciones locales del cuadro infeccioso de inicio.

1.5.2 Manifestaciones clínicas de disfunción de orgánica aguda

La disfunción de órganos incluye comúnmente hipotensión, síndrome de distrés respiratorio agudo, alteración del estado mental, lesión renal aguda, íleo, disfunción hepática, coagulación intravascular diseminada, disfunción adrenal y síndrome del enfermo eutiroideo. El efecto acumulativo de la disfunción de órganos, es el predictor más fuerte de la mortalidad. Para los pacientes que sobreviven más allá de la sepsis temprana, la inmunosupresión aumenta el riesgo de infecciones secundarias.

El compromiso pulmonar clásicamente se manifiesta como el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), que se define como la hipoxemia con infiltrados bilaterales de origen no cardiaco. El diagnóstico diferencial con neumonía nosocomial es muy difícil.⁹⁹⁻¹⁰²

A nivel cardiovascular, cursa principalmente como hipotensión o un nivel de lactato sérico elevado. Después de la expansión de volumen adecuada, la hipotensión persiste con frecuencia, requiriendo el uso de vasopresores y puede ocurrir disfunción miocárdica.¹⁰³⁻¹¹⁴

La disfunción del sistema nervioso central se manifiesta típicamente como obnubilación o delirio u otros signos de encefalopatía no focal.¹¹⁵⁻¹²² La polineuropatía del paciente crítico y miopatía también son comunes, especialmente en pacientes con una estancia prolongada en la UCI.¹²³⁻¹²⁷ Con frecuencia este proceso impide la retirada de la ventilación mecánica, en parte debido a la afección del nervio frénico.¹²⁸ Los pacientes que sobreviven a este proceso pueden tardar meses en recuperarse completamente de la debilidad muscular.¹²⁹

Las alteraciones renales consisten en oliguria con aumento de creatinina, pero también puede consistir en poliuria que puede deberse a la propia disfunción renal o a la hiperglucemia. La función renal puede complicarse por toxicidad medicamentosa.¹³⁰⁻¹³²

A nivel digestivo son comunes síntomas inespecíficos, como náuseas vómitos que pueden confundir con un cuadro de gastroenteritis, también pueden presentar úlceras gástricas de estrés o íleo paralítico. El shock séptico puede acompañarse de graves complicaciones, como la necrosis hepatocelular aguda o la isquemia intestinal aguda.¹³³⁻¹³⁶

La CID o coagulopatía de consumo es muy frecuente en los casos de sepsis grave y clínicamente se manifiesta con la aparición de necrosis tisulares y disfunción orgánica generalizada, como consecuencia del desarrollo de trombosis diseminadas y con la tendencia al sangrado, como consecuencia del consumo exagerado de factores de la coagulación.¹³⁷⁻¹⁴⁰

1.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se establece mediante los criterios intrínsecos en definiciones, no obstante es variable e inespecífica, la enfermedad puede presentarse de una forma explosiva ó con sintomatología manifiesta que nos alertan sobre la gravedad del paciente, ó con sintomatología solapada que puede confundirnos con un proceso banal. No todos los pacientes con sepsis presentan criterios diagnósticos de SIRS. La base fundamental de diagnóstico que pone a prueba la pericia del profesional es una **historia clínica** y **exploración física** meticulosas apoyadas en las pruebas de laboratorio, el diagnóstico microbiológico y las técnicas de imagen.¹⁴¹⁻¹⁴⁴

1.6.1 Historia clínica

La evaluación inicial del paciente debe empezar con la elaboración de una historia clínica de forma detallada y cuidadosa, prestando especial atención a la evaluación de cualquier trastorno subyacente o predisponente. Se debe documentar la situación basal, las actividades recientes, el uso cercano de antimicrobianos, procedimientos invasivos, los cambios de medicamentos, posibles intoxicaciones, estados de inmunosupresión y las situaciones epidemiológicas (contactos con enfermos, viajes, hábitos, picaduras).

1.6.2 Exploración física

La exploración general, nos puede aportar datos sobre la gravedad, no obstante hay que tener en cuenta que algunos pacientes principalmente inmunodeprimidos pueden no presentar síntomas. Ciertos signos como **taquipnea, escalofríos, ansiedad** y malestar general pueden constituir el inicio de una sepsis.

La exploración por aparatos y sistemas nos puede revelar el foco y la etiología del cuadro. (tabla 3)

Tabla 3. Exploración física aproximación diagnostica

Cabeza y cuello	Rigidez de nuca	Meningitis	N.meningitidis.S.pneumoniae.L.momnocy togenes Meningitis etología vírica
	Alteraciones pares craneales	Encefalitis Abscesos	HPV CMV otras encefalitis virales Streptococcus anaerobios
	Dolor a la presión en senos	Sinusitis	S.pneumoniae BGN
	Exudado faringe amigdalal	Amigdalitis	Streptococcus sp
	Lesiones bucales		Herpes,hongos.
	Supuración otica	Otitis	S.pneumoniae.H.influenzaeS.aureus.BGN
	Agrandamiento ganglionar		HPV ,CMV EBV Toxoplasmosis VIH descartar inmunosupresión
Auscultación cardiaca	Alteraciones del ritmo soplos	Endocarditis	Staphylococcus.Streptococcus
Auscultación pulmonar	Alteraciones en la auscultación pulmonar	Neumonía SSD	S.pneumoniae,BGN Legionella
Exploración abdominal	AB doloroso ,AB en tabla tumoraciones, hepatoesplenomegalias	Perforación abdominal Abscesos cirrosis	BGN anaerobios E.faecalis
	Puñopercusion renal positiva	Pielonefritis	BGN E.faecalis
Lesiones piel tejidos blandos			
Primarios	Celulitis ,fascitis necrotizante		Streptococcus.Staphylococcus BGN Anaerobios
Manifestaciones Distancia de procesos infecciones	Petequias Pioderma gangrenosos lesiones de Janeway Exantemas etc.	CID Bacteriemia Endocarditis Enfermedad sistémica viral	Meningococemia. Otras bacteriemias Streptococcus Staphylococcus P.aeruginosa Streptococcus

1.6.3 Diagnóstico de laboratorio

Las pruebas de laboratorio ayudan a identificar la causa de shock y el grado de afectación, deben realizarse de inmediato, e incluyen dos pilares básicos: Hematología, Bioquímica básica.

1.6.3.1 Hematología

Se recomiendan un hemograma (recuento y fórmula leucocitaria), un estudio de coagulación (plaquetas, dímero y fibrinógeno).¹¹

1.6.3.2 Bioquímica

Debe incluir una bioquímica básica, ionograma (cloro, sodio, potasio, bicarbonato), urea, creatinina, pruebas de función hepática, examen de orina, amilasa, lipasa, pruebas de coagulación, enzimas cardíacas, **lactato sérico**,¹⁴¹⁻¹⁴⁶ gasometría arterial, determinación de tóxicos y si es factible debe incluirse PCT y PCR.

Proteína C reactiva (PCR) y procalcitonina (PCT). Niveles altos orientan hacia la existencia de una infección sistémica, grave y/o bacteriana en lugar de viral o inflamatoria, por lo que son de utilidad para el manejo y control evolutivo de dichos cuadros. Niveles de PCR ≥ 20 mg/l y PCT > 2 ng/ml en pacientes con clínica compatible con sepsis grave y leucocitosis y/o leucopenia orientarían a un origen bacteriano en lugar de viral. Niveles de PCR < 8 mg/l y PCT $< 0,5$ ng/ml se asocian a una probabilidad de bacteriemia-sepsis por debajo del 1-2% (salvo en pacientes con hepatopatía).¹⁴⁷⁻¹⁴⁸

Hoy en día la PCT está considerada como el marcador más específico y precoz aunque existen otros marcadores en fase de estudio muy prometedores, como la IL-8 o el factor soluble TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells).¹⁴⁹⁻¹⁵⁴

1.6.4 Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico microbiológico se basa en la demostración del patógeno o de su huella en el sistema inmune del huésped en un contexto clínico determinado.¹⁵⁵ La confirmación etiológica en el laboratorio, es necesaria para dirigir el tratamiento antimicrobiano y epidemiológicamente para conocer el nicho ecológico. La información que se puede obtener del laboratorio, dependerá de la calidad de la muestra remitida. **Se debe contactar con el microbiólogo para que en función de la sospecha clínica y del foco, canalice las pruebas para una mayor rapidez y rentabilidad diagnóstica.** La obtención de la muestra debe ser precoz (antes del tratamiento antibiótico) y adecuada en condiciones de asepsia, evitando la exposición de la muestra a desinfectantes.¹⁵⁶

1.6.4.1 Elección de pruebas diagnósticas según sospecha clínica.

La elección de las pruebas se deben basar en la sospecha clínica, puesto que los agentes etiológicos requieren procedimientos específicos. (Tabla 4)

Tabla 4. Pruebas según sospecha diagnóstica

Infección SNC	Meningitis	Gram ,cultivo, PCR N.meningitidis,L.monocytógenesS.neumoniae PCR viral ,TBC Ag ,criptococo Hemocultivos
	Encefalitis	PCR virus Gram cultivo Hemocultivos
	Abscesos	Gram cultivo Hemocultivos
Patología cardíaca	Endocarditis	Gram, cultivo, Hemocultivos
	Pericarditis miocarditis	PCR ,serologías víricas gram ,cultivo Hemocultivos
Infección respiratoria	Neumonía derrame pleural	Gram cultivo PCR serología si sop de atipias Zhiel PCR y cultivo si TBC Ag legionella neumococo en orina Hemocultivos
Infección abdominal	Infección partes blandas	Gram, cultivo, Hemocultivo
	Ascitis	Gram ,cultivo, Hemocultivos
	Abscesos hepáticos	Gram ,cultivo ,examen en fresco para descartar parásitos, Hemocultivos
	Diarrea	Gram ,cultivo ,examen en fresco para descartar parasitos,hemocultivo
Infección aparato genito-urinario	Inf orina	Cultivo, hemocultivos
	Prostatitis abscesos	Gram, cultivo, Hemocultivo
	Inf genital	Gram,cultivo selogía lues, Mycoplasma ureaplasma Hemocultivo
Infección de piel y tejidos blandos	Celulitis abscesos	Gram, cultivo, Hemocultivo
Infección dispositivos intravas		Hemocultivo de los diferentes dispositivos cultivo punta catéter zona inserción
Infecciones en viajero		Gota gruesa ,serología parásitos serología .Serologías víricas ,Zhiel y cultivo TBC Hemocultivo

1.6.4.2 Hemocultivo

Hasta la actualidad, el hemocultivo continúa siendo el método de referencia para el diagnóstico de la sepsis, en los pacientes con fiebre debe realizarse siempre, independientemente del foco infeccioso. Es positivo en el 50% de los casos .La extracción se efectúa según el protocolo de toma de muestras establecido por el servicio de microbiología en líneas generales si la gravedad del enfermo lo permite se extraen de 2-3 tomas preferiblemente en diferentes lugares de venopunción o dispositivos intravasculares, no es

necesaria la presencia de fiebre, al estar en situación de bacteriemia mantenida o inmunosupresión.¹⁵⁷

No obstante, los hemocultivos presentan numerosas limitaciones, tales como su baja sensibilidad, especialmente cuando se encuentren implicados en el proceso séptico microorganismos con requerimientos especiales de crecimiento como el *A.fumigatus* o bien, cuando el paciente haya recibido previamente tratamiento antibiótico que inhiba el crecimiento del agente causal en los medios de cultivos habituales.¹⁵⁸ Otro inconveniente es el intervalo diagnóstico, la detección del crecimiento del microorganismo en el hemocultivo, por lo general, no ocurre antes de las 6-12 horas posteriores a su incubación. La identificación definitiva y evaluación de la sensibilidad a los antibióticos del agente causal, requiere, al menos, 24 ó 48 horas.¹⁵⁹

El diagnóstico de la sepsis debe evolucionar hacia nuevos métodos que detecten la presencia de microorganismos, tanto viables como no, en el torrente sanguíneo. El desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico rápido de sepsis que complementen al hemocultivo tradicional, supone una necesidad importante desde el punto de vista clínico.¹⁶⁰⁻¹⁶²

1.6.4.3 Pruebas serológicas

El diagnóstico de micosis sistémica (generalmente candidiasis) en el paciente en estado crítico puede ser desafiante. La mala evolución de las IFI se debe, en parte, a las dificultades para su diagnóstico microbiológico en sus primeros estadios. El hemocultivo sólo es eficaz en el 50% de las infecciones invasivas por *Candida* y *Fusarium*, y es excepcionalmente positivo en las aspergilosis invasiva. Por su parte, los cultivos de lavado broncoalveolar o cepillado bronquial sólo son positivos en < 50% de los pacientes con aspergilosis pulmonar invasiva. Además, los cultivos positivos de muestras no estériles pueden deberse tanto a colonización como a infección, y la distinción entre ambas no siempre es fácil.¹⁶³ Las metodologías de diagnóstico rápido, como los análisis de detección de anticuerpos y antígenos, pueden ayudar a detectar la candidiasis en el paciente de UCI. Estas pruebas sugeridas han demostrado tener resultados positivos mucho antes que los métodos de cultivo estándar.¹⁶⁴⁻¹⁷¹ Normalmente, se recomienda realizar el 1,3 β -d-glucano, análisis de anticuerpos manano y antimanano cuando exista sospecha de candidiasis invasiva, no son muy determinantes, pueden presentar falsos

positivos, sobre todo, cuando el paciente está colonizado y se requieren estudios adicionales sobre su utilidad diagnóstica en el manejo de micosis en la UCI.¹⁷²

Por lo tanto, es evidente la necesidad de realizar un diagnóstico temprano de los pacientes críticos con sospecha de IFI que facilite la instauración temprana del tratamiento antifúngico, para así, disminuir la elevada tasa de mortalidad de estas infecciones.¹⁷³⁻¹⁷⁵

1.6.4.4 Diagnóstico molecular de la sepsis.

En los últimos años, se propusieron varios métodos basados en técnicas de biología molecular con el fin de optimizar el diagnóstico definitivo de la sepsis, que permitiesen la implantación de una terapia dirigida temprana y redujese la morbilidad y mortalidad. Las técnicas empleadas que resultaron ser más eficaces para este fin, fueron por un lado los métodos de hibridación y en segundo lugar los métodos de amplificación basados en la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**). Estas técnicas se basan en el uso de cebadores universales que se unen a regiones conservadas y específicas del genoma bacteriano. Amplifican el gen **RNAr 16s** ó **23s**, presente en todas las bacterias y el gen **RNAr 18s** de hongos. Se trata de secuencias específicas cortas denominadas “oligonucleótidos firma” que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético y que pueden utilizarse en la identificación de bacterias u hongos.¹⁷⁶

Los métodos de hibridación fueron rápidamente sustituidos por los métodos de PCR en el laboratorio clínico, ya que las técnicas de hibridación resultaron ser muy laboriosas, técnicamente muy complicadas y conllevaban un elevado tiempo de realización.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

En la actualidad el diagnóstico molecular de la sepsis, se basa en la realización de la **PCR a tiempo real** que permite la detección e identificación de bacterias u hongos directamente de sangre total. Estas técnicas realizan la amplificación, detección y cuantificación de los productos de PCR en el mismo sistema sin necesidad del posprocesamiento del amplificado, además permite la detección y cuantificación del producto final de varias muestras a la vez.¹⁸⁰⁻¹⁸¹

1.6.5 Diagnóstico por imagen

Otros procedimientos de imagen, como los estudios electrofisiológicos, RX abdominal, ecografía abdominal o la ecocardiografía, la tomografía computarizada, la resonancia magnética, etc., son de gran utilidad para localizar la infección inicial desencadenante de la sepsis y para evaluar sus complicaciones.¹⁸²⁻¹⁸⁶

1.6.6 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la sepsis y especialmente de sus complicaciones, es muy amplio, e incluye, entre otras, a todas las demás enfermedades capaces de causar el SRIS. En cuanto al diagnóstico diferencial del shock séptico, es importante tener en cuenta que la mayor parte de cuadros de shock más comunes, como el cardiogénico o el hipovolémico, se caracterizan por el aumento de las resistencias vasculares periféricas. Sin embargo, existen algunos tipos de shock, en general poco frecuentes con una fisiopatología similar a la del shock séptico que incluye la disminución de las resistencias vasculares periféricas; se trata del shock anafiláctico y del shock relacionado con el beriberi, la cirrosis hepática, la sobredosis de narcóticos o el Síndrome de fuga capilar sistémica conocida como enfermedad de Clarkson.¹⁸⁷⁻¹⁹⁵

1.7 TRATAMIENTO

1.7.1 Abordaje terapéutico de la sepsis

En un importante esfuerzo por comprender y tratar adecuadamente la sepsis grave y el shock séptico, en el año 2002 surgió la Surviving Sepsis Campaign (SSC). Se trata de una iniciativa internacional sostenida por varias Sociedades Científicas de cuidados críticos del mundo, que tiene por objetivo disminuir la mortalidad de esta patología por medio de la elaboración e implementación de guías de práctica clínica.¹⁹⁶ La última revisión publicada recientemente, modifican los paquetes de medidas ("*bundles*") recomendados hasta ahora. El "antiguo" conjunto de medidas de tratamiento se elimina, y las medidas de resucitación, se desdoblan en dos grupos, aumentando el énfasis en el **reconocimiento y tratamiento**

precoces de la sepsis. Los dos nuevos paquetes de medidas se deben cumplir en las **3 y en las 6 primeras horas**. Las guías recomiendan emplear el cumplimiento de los paquetes de medidas como indicadores de calidad.¹⁹⁷

Los principios de la gestión paquete inicial, son proporcionar reanimación cardiorrespiratoria y mitigar las amenazas inmediatas de infección no controlada. La resucitación requiere el uso de fluidos y vasopresores por vía intravenosa con la terapia de oxígeno y ventilación mecánica proporcionada según sea necesario.

CONJUNTOS DE RECOMENDACIONES DE LA CAMPAÑA PARA SOBREVIVIR A LA SEPSIS

PASOS QUE HAN DE REALIZARSE EN UN PLAZO DE 3 HORAS:

- 1) Medir el nivel de lactato
- 2) Extraer hemocultivos antes de administrar antibióticos
- 3) Administrar antibióticos de amplio espectro
- 4) Administrar 30 ml/kg de cristaloides para hipotensión o ≥ 4 mmol/l de lactato

PASOS QUE HAN DE REALIZARSE EN UN PLAZO DE 6 HORAS:

- 5) Aplicar vasopresores (para hipotensión que no responde a la reanimación inicial con fluidos) para mantener una presión arterial media (PAM) ≥ 65 mm Hg
- 6) En caso de hipotensión arterial persistente a pesar de la reanimación de volumen (choque séptico) o 4 mmol/l (36 mg/dl) de lactato inicial:
 - Medir la presión venosa central (PVC)*
 - Medir la saturación de oxígeno venosa central (ScvO₂)*
- 7) Volver a medir el lactato si inicialmente era elevado*

*Los objetivos de la reanimación cuantitativa incluidos en las recomendaciones se corresponden con una PVC ≥ 8 mm Hg, ScvO₂ $\geq 70\%$ y normalización del lactato.

Figura 1. Conjuntos de recomendaciones de la Campaña para sobrevivir a la sepsis.

1.7.2 Administración de fluidos

La administración temprana de líquidos por vía intravenosa, es el enfoque principal de los primeros minutos de la terapia de la sepsis grave. Ha habido un largo debate sobre la elección y adecuado volumen de líquido por vía intravenosa, las directrices actuales recomiendan cristaloides como la elección con un fluido inicial mínimo de 30 ml / kg, de los cuales una parte podría ser la albúmina.^{10,78,198-202}

1.7.3 Vasopresores

La norepinefrina se recomienda como la primera opción para el uso de vasopresores en pacientes con shock séptico.^{10,203-205} La dopamina se había utilizado ampliamente como un agente de primera línea pero en comparación con la norepinefrina, se asocia con una mayor tasa de arritmia. No se recomienda la dopamina en dosis bajas para la protección renal. Si se

necesita una segunda dosis de vasopresores, se puede utilizar epinefrina o vasopresina.²⁰⁵ La vasopresina se puede agregar a la noradrenalina, pero no se recomienda como un único agente.²⁰⁶ Por último, los agentes inotrópicos como dobutamina, se pueden utilizar si hay evidencia de disfunción miocárdica o hipoperfusión en curso a pesar de la reanimación con líquidos y la iniciación de vasopresores.^{78.207-208}

1.7.4 Tratamiento infección

La administración de tratamiento antimicrobiano empírico eficaz de forma inmediata es de vital importancia, cada hora de retraso o de tratamiento inadecuado, aumenta de forma directa la mortalidad.²⁰⁹⁻²¹¹

Las unidades de críticos deberán ponerse en contacto con el servicio de microbiología, el análisis en conjunto del proceso infeccioso, permite canalizar las pruebas diagnósticas, para una mayor rentabilidad y adecuar la terapia empírica de una forma eficaz.

Normalmente de inicio, se pautan antibióticos de amplio espectro hasta la identificación del agente etiológico responsable. El **microbiólogo debe comunicar de forma inmediata al clínico el resultado del aislamiento,** a la vez que se realizan los estudios de sensibilidad. La evaluación clínica diaria y adecuar el tratamiento una vez que dispongamos del antibiograma es necesaria para desescalar, mantener antibióticos de amplio espectro de forma continuada, aumenta la resistencia antibiótica, favorece otras infecciones por microorganismos resistentes, en consecuencia la mortalidad y el gasto hospitalario.²¹¹⁻²¹⁴

1.7.5 Otras medidas terapéuticas

El conjunto de recomendaciones completas se especifican en las guías 2013, en líneas generales, algunas consideraciones importantes son:

1.7.5.1 Corticoides

Las directrices actuales, recomiendan iniciar corticosteroides por vía intravenosa a dosis bajas en los pacientes con Shock refractario, choque, que han permanecido hemodinámicamente inestables, incluso después de la reanimación con líquidos adecuada y el uso de vasopresores.^{10.215-216}

1.7.5.2 Control de glucemia

El control de la glucemia en los pacientes sépticos, no ha estado exento de controversia, mientras que se aconsejaba la terapia intensiva con insulina, un estudio posterior, demostró, que la terapia intensiva con insulina no disminuye la mortalidad.²¹⁷ En la actualidad, las directrices recomiendan administrar insulina cuando dos mediciones consecutivas sean superiores a 180 mg/dl el objetivo, es mantener la glucemia en el rango 180mg/dl -110mg/dl. El control de la glucemia debe realizarse de inicio cada 2 horas y una vez se estabilice la glucemia, cada 4 horas. Recientes estudios abogan por la terapia de ciclo cerrado automatizado, basado en las mediciones de glucosa subcutánea continua, es un enfoque seguro y eficaz para el control de la glucosa en adultos críticamente enfermos.²¹⁸⁻²¹⁹

1.7.5.3 Asistencia respiratoria mecánica (ARM) protectora

En los pacientes con ARM se utiliza un volumen corriente de 6 ml/kg de peso y una presión meseta igual o menor de 30 cm H₂O; este tipo de ventilación protectora disminuye la mortalidad en pacientes con sepsis y lesión pulmonar aguda o SDRA.^{10, 220-222}

Otras medidas como administración de hemoderivados o medidas de soporte, se incluyen en las recomendaciones del 2013. En general, se deberán realizar el conjunto de medidas necesarias encaminadas al control del proceso infeccioso, como intervenciones quirúrgicas y drenaje de abscesos. En definitiva, la gestión de los pacientes críticos, deben incluir una discusión multidisciplinaria de las medidas a tomar en cada caso particular.

1.7.5.4 Nuevas estrategias

A pesar de los esfuerzos por desarrollar nuevos fármacos, la mayoría de ellos han fracasado. Recientemente, el uso de células mesenquimales que reparan la lesión y reducen la inflamación,²²³⁻²²⁴ terapias basadas en la purificación de la sangre²²⁵ y aunque con resultados contradictorios la utilización de perfusión continua de polimixina B para contrarrestar los efectos perjudiciales de las bacterias en el endotelio,²²⁶⁻²²⁷ la modulación de la inmunidad innata con el uso de inmunoglobulina infusa (IgM enriquecido inmunoglobulinas)²²⁸ y las terapias antioxidantes como la melatonina,²²⁹ parece ser prometedoras. Otros estudios perfilan la aspirina como un tratamiento potencial en la sepsis.²³⁰

Hasta la fecha, se han realizado más de 100 ECA (fases III) que buscan en las terapias que puedan modular la inflamación, con resultados contradictorios. Con más de 200 objetivos potenciales, es preocupante que no existen terapias definitivas para mejorar el resultado en pacientes sépticos. Serán necesarias más investigaciones para el desarrollo de nuevas terapias en la sepsis.²³¹

2.-OBJETIVOS



2.1 Objetivo principal

Hemos querido evaluar la aportación del método de diagnóstico molecular **SeptiFast** (ROCHE), en el diagnóstico precoz de la sepsis, con el propósito analizar el rendimiento clínico de la técnica manual, previo, al diseño de un método de extracción automatizado, basado en nanopartículas magnéticas que sustituya al manual, buscando acortar el intervalo de repuesta diagnóstica que permita adecuar la terapia empírica de forma precoz, en consecuencia, la repercusión directa, suponga un descenso importante de la mortalidad, la estancia hospitalaria y los costes sanitarios.

2.2 Objetivos específicos

1º.- Comparar el rendimiento de **SeptiFast** (ROCHE) con el hemocultivo y otras técnicas de diagnóstico convencional utilizadas en el laboratorio de microbiología para la detección de microorganismos infecciosos en pacientes con sospecha de sepsis.

2º.- Modificar la técnica de extracción de ADN en la preparación de la muestra para PCR. Aplicación del sistema automático *MagNA PureCompact* - Nucleid Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) comparando su eficacia con el equipo *SeptiFast* Prep Kit, recomendado por el fabricante.

3º.- Análisis de la funcionalidad de método automatizado *MagNA PureCompact* para conseguir identificar las dianas de Master list *Septifast*.

5º.- Estudio de la interferencia del ADN genómico en el proceso de extracción automático.

5º.- Evaluación clínica del método de extracción de ácidos nucleídos automatizado.

6º.- Beneficio terapéutico del diagnóstico molecular.

7ª Rendimiento económico de *SeptiFast* en pacientes con sepsis. Estimación de costes. Consumo de recursos.

8º- Estudio del polimorfismo del promotor del receptor del LPS, CD14, a partir del ADN obtenido de las muestras procesadas mediante *SeptiFast* y su posible implicación en la evolución clínica de la sepsis. Influencia en nuestros grupos de pacientes.

9º.- Análisis de el rendimiento de *SeptiFast* para la detección de infecciones polimicrobianas.

10º- Diagnóstico de Aspergilosis invasiva a partir de muestras de sangre periférica mediante *SeptiFast*.

11º- Aplicación de la técnica *SeptiFast* en el diagnóstico de las endocarditis bacterianas. Estudio comparativo de las muestras procedentes de Cirugía Cardíaca (hemocultivo, cultivo válvulas cardíacas, tejido periprotésico, líquido pericardio, etc.) procesadas por cultivo/*SeptiFast*.

12º.- Directrices futuras en las que el método de extracción automatizado aplicado a la PCR pudiera aportar un mejor apoyo en el diagnóstico de la sepsis.

3-MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Criterios clínicos de selección de pacientes y periodo de estudio

En este estudio se utilizaron muestras procedentes de pacientes con SRIS y sospecha de sepsis ingresados en las UCI del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago recogidas en diferentes fases.

En primer lugar, se seleccionaron dos grupos de pacientes ingresados en la UCI del Hospital Clínico Universitario de Santiago, posteriormente un tercer grupo de pacientes ingresados en la UCI del Hospital de Conxo y finalmente un grupo de pacientes ingresados en Hospital clínico Universitario en el servicio de Cirugía Cardíaca y REA para estudio de endocarditis.

3.1.1 Primer grupo: Grupo observacional

De enero a junio de 2006 se incluyeron 54 pacientes a los que se realizaron 8 determinaciones seriadas a lo largo de su estancia en la UCI, recogiendo una toma para hemocultivo al mismo tiempo que para la PCR. El intervalo de recogida de las 8 muestras fue como sigue: Una muestra cada día durante los 4 primeros días, seguidas de una muestra a los 7, 14, 21 y 28 días de la primera.

Independientemente de la toma destinada a la PCR y sus correspondientes hemocultivos (con el sistema FN/FA BacT-Alert, *Biomerieux*, France), en cada paciente se siguieron realizando las pruebas habituales para el diagnóstico microbiológico convencional así como, las determinaciones bioquímicas pertinentes y cualquier otro estudio que fuese considerado oportuno de acuerdo con su estado clínico y evolución. Se registraron el diagnóstico inicial y el origen infeccioso de la sepsis, además de la puntuación de las escalas APACHE II y SOFA al ingreso como valoración de la gravedad y disfunción orgánica.

Las muestras de esta primera fase, sirvieron como grupo de control para confirmar la seguridad y precisión de la técnica.

3.1.2 Segundo grupo: Grupo intervencionista

Entre julio y diciembre de 2006 se recogieron muestras de otros 48 pacientes con SRIS y factores clínicos de riesgo de infección ingresados en el mismo servicio que los anteriores, a los que se realizaron 3 determinaciones para PCR con la correspondiente toma simultánea para hemocultivo, coincidiendo con indicaciones clínicas y decisiones críticas de terapia antibiótica.

Lo mismo que en el primer grupo, en cada paciente se siguieron realizando todos los estudios convencionales que se consideraron oportunos para la confirmación de sus diagnósticos, así como la valoración de su estado.

Los resultados obtenidos con la PCR *SeptiFast* en este segundo grupo de pacientes, fueron informados telefónicamente de inmediato para facilitar la toma de decisiones terapéuticas oportunas, y así mantener o modificar el tratamiento empírico instaurado.

3.1.3 Tercer grupo control para valoración del nuevo método de extracción automatizado

Posteriormente, entre febrero de 2008 y junio de 2010 se añadieron muestras de un tercer grupo de 400 pacientes, ingresados en la UCI del Hospital de Conxo siguiendo los mismos criterios de selección e informes que en el segundo grupo de los anteriores, donde se comparó, el rendimiento clínico del el nuevo método de extracción.

3.1.4 Cuarto grupo pacientes seleccionados estudio endocarditis

Finalmente entre agosto de 2007 y septiembre de 2009 se diferenció un cuarto grupo de pacientes con diagnóstico o sospecha de endocarditis bacteriana, en los que además de llevar a cabo la técnica en sangre, hemos podido ensayar su aplicación sobre las vegetaciones del tejido valvular.

3.2 Muestras y técnicas microbiológicas convencionales de diagnóstico

Independientemente de la toma destinada a la PCR, en cada paciente se siguieron realizando las pruebas habituales para el diagnóstico microbiológico convencional, así como las determinaciones bioquímicas pertinentes y cualquier otro estudio que fuese considerado oportuno de acuerdo con su estado clínico y evolución.

3.2.1 Hemocultivos

Se realizaron hemocultivos según el protocolo habitual inoculando la sangre en los frascos con resinas de (FN / FA BacT-Alert, Biomerieux, Francia). Las botellas se incuban en el sistema automatizado de hemocultivos (Biomerieux, Francia). Una vez se detecta crecimiento, se procede a la retirada de las botellas y se realiza el Gram y siembra en medios según protocolo. La visualización de microorganismos en la tinción Gram que presuntamente son compatibles con infección sanguínea son comunicados de forma inmediata telefónicamente al clínico responsable.

3.2.2 Estudios de microbiología convencional

Además de hemocultivos se realizan cultivos de los posibles focos infecciosos, así como estudios serológicos u otros estudios según la sospecha clínica que faciliten el diagnóstico etiológico de la infección.

3.2.3 Procesamiento e identificación de los microorganismos por métodos fenotípicos

Los microorganismos aislados se identificaron mediante métodos automatizados fenotípicos (Vitek II (Biomerieux Francia) ó por métodos fenotípicos de identificación manual en los casos de microorganismos que para su identificación precisen de requerimientos específicos.

3.2.4 Diagnóstico molecular: Multiplex SeptiFast®

La prueba LightCycler M SeptiFast® es una prueba de amplificación nucleídos in vitro para la detección e identificación de ADN de bacterias y hongos en sangre y como la mayoría de las pruebas de diagnóstico molecular, este método tiene un flujo de trabajo

diseñado en tres fases: extracción, amplificación / detección (PCR en tiempo real) y el análisis de datos.²³²

3.2.5 Extracción de ADN

La preparación de las muestras para el test LightCycler® *SeptiFast* se realizó, en las primeras etapas, siguiendo las recomendaciones del fabricante mediante un método manual de extracción, que sigue a un paso previo de lisis mecánica con el sistema MagNa Lyser. Este sistema homogeniza la muestra y rompe las estructuras celulares mediante el uso de partículas de vidrio. A continuación, mediante la aplicación del equipo *SeptiFast* Prep Kit, se lleva a cabo la extracción manual que consta de los siguientes pasos siguientes pasos: a) lisis química con Proteinasa k a elevada temperatura en un tampón de lisis caotrópico, que libera el ácido nucleico y protege el ADN liberado de las DNAasas presentes en la sangre; b) filtrado a través de una columna de centrifugación con filtro de fibra de vidrio, de tal forma que el ADN genómico humano y el ADN objetivo bacteriano/fúngico se fije en la superficie de la columna; c) lavado en 2 fases para eliminar las sustancias no unidas tales como: sales, proteínas y otros fragmentos celulares; y por último d) una elución final a elevada temperatura. Al igual que el resto de los sistemas manuales de extracción de ácidos nucleicos, este método es muy laborioso y conlleva un elevado tiempo de manipulación, además de personal especializado para su realización. Por otro lado, existe una elevada posibilidad de contaminación cruzada, especialmente si se procesan muchas muestras a la vez. Además la eficacia de extracción depende, en cierto modo de la habilidad del operario.²³³⁻²³⁴

La laboriosidad de la técnica y el alto índice de contaminaciones refleja la necesidad de la búsqueda de un método alternativo para la preparación de la muestra para el test LightCycler® *SeptiFast* que elimine los problemas del método manual de referencia y permita la implantación de la prueba en la rutina de un laboratorio de microbiología clínica. Uno de nuestros objetivos es buscar un sistema automático adaptable al sistema *SeptiFast*. La incorporación del sistema automático en el proceso de extracción disminuye el tiempo de realización de la prueba, la tasa de error y evita la contaminación accidental por parte del operario.²³⁵

3.2.5.1 Protocolo extracción del ADN bacteriano por el método SeptiFast Prep Kit:

1,5 ml de sangre total, se someten a lisis mecánica con bolas de vidrio y cerámica en el sistema MagNALyser® (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany) mediante agitación durante 70seg. a 7000 rpm. Después de la lisis, el ADN bacteriano se extrae utilizando el equipo manual SeptiFast Prep Kit Mgrade (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante: 1000µl de las muestras lisadas se incuban a 56 ° C durante 15 min en agitación suave con proteinasa K y un buffer de lisis caotrópico, que contiene 50% guanidinio tiocianato, 20% tritón X-100 y 2% de proteinasa K. De esta forma se libera el ácido nucleico y se protege de la degradación por parte de las DNAsas presentes en la muestra de sangre total. Se introducen, en este paso, 10 µl de control interno (CI) en cada ejemplar junto con el buffer de lisis. A continuación, la mezcla de muestra y buffer de lisis se traslada a una columna de fibra de vidrio y se centrifuga a 1900g durante 3 min. El ADN humano y el ADN objetivo de bacterias y hongos de la muestra se adsorbe en la superficie de la fibra de vidrio y las sustancias no unidas, como sales, proteínas, fragmentos celulares... se retiran por pasos de lavado (4200g; 2min), con 1800 ul *de inhibitor renoval buffer*, que contiene 0,2% de cloruro de sodio, etanol al 80%, Tris-HCl buffer. Los ácidos nucleídos adsorbidos, se elúyen de la columna después de una incubación, durante 5min con 300ul de buffer de elución, precalentado a 70 ° C, y se centrifuga durante 2 minutos a 4200g.

3.2.5.2 Diseño de método automatizado: Extracción del ADN bacteriano por el método MagNA Pure Compact.

Del mismo modo que por el método manual, 1,5 ml de sangre total se someten a lisis mecánica mediante el uso del agitador automático MagNALyser® (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany). Tras la lisis aprox. 400 µl de la muestra lisada se transfiere a un tubo para muestras alojado en la gradilla del sistema MagNA Pure Compact (MPC) e inmediatamente antes de iniciar la extracción automática, se añaden 4µl de CI en cada ejemplar. La extracción se lleva a cabo en el equipo MPC, utilizando los cartuchos de reacción del MPC Nucleid Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y seleccionado el protocolo “DNA-Bacteria” con volumen de elución final de 200µl.

Como evaluación de esta técnica automática para su aplicación a *SeptiFast*, se realizaron diferentes experimentos que se describen más adelante, con ADN estándar de *E. coli* (Sigma-Aldrich (USA) producto nº D4889) cepas bacterianas del listado de *SeptiFast* y muestras clínicas de pacientes con criterios de sepsis. El protocolo de extracción seleccionado para el ADN estándar en solución, a diferencia del especificado antes (“DNA-Bacteria”) fue el de “Lisis externa”, puesto que este ADN utilizado como control no precisa de lisis para su liberación. En este caso se parte igualmente de 400µl (solución de ADN control en buffer TE pH 8) pero la elución final se concentra en un volumen de 100µl. Por el mismo motivo, al no ser necesario romper la pared bacteriana, se prescindió de la etapa previa de lisis mecánica en *MagNA Lyser*.

Como quiera que esta modificación metodológica ha podido condicionar los resultados a la hora de comparar el ADN recuperado a partir de las distintas fuentes, hemos repetido la prueba con el ADN estándar siguiendo el mismo protocolo que en la lisis bacteriana, para objetivar en qué medida los distintos procesos que ofrece el sistema automático pueden influir en el rendimiento final de la extracción.

3.2.6 PCR en tiempo real

El sistema LightCycler® **SeptiFast** Test (Roche molecular Systems) es un método de PCR a tiempo real que detecta patógenos a partir de sangre total. El sistema detecta los microorganismos que provocan el 90% de las infecciones sanguíneas. Teniendo en cuenta que en la etiología de la bacteriemia en los pacientes de UCI, según el estudio según el estudio ENVIN 2015 los microorganismos más frecuentes están las bacterias gram negativas destacan microorganismos multirresistentes tales como *E.coli* (14.32%) *Pseudomonas aureginosa* (12.93%), *Klebsiella pneumoniae* (9.35%) (*Acinetobacter baumannii* (2.66%), *Enterobacter cloacae* (4.09%), cocos gram positivos, como los *S.epidermidis* (8.55%), *Staphylococcus aureus* (4.09%) *Enterococcus faecalis* (7.01%); *Enterococcus faecium* (3.29%) y la tasa de candidemias se sitúa entre 33%-55%, por lo que podemos afirmar que el sistema incorpora los principales patógenos productores de bacteriemia en estas unidades.²³⁶⁻²³⁷

Algunos de los microorganismos que detecta son los que con frecuencia se tratan de forma inadecuada con los tratamientos empíricos, tales como: *Enterococcus spp.*, *Candida spp* y otros son microorganismos de difícil tratamiento como: *Acinetobacter*,

Stenotrophomonas, *Pseudomonas*... por lo que la identificación temprana favorecerá la instauración rápida de una terapia adecuada. En la Tabla 1 se muestran todos los microorganismos que amplifica el sistema. Al tratarse de un sistema de amplificación que parte de sangre total y no de cultivo positivo, esta prueba detecta tanto bacterias/hongos viables como no viables, además puede detectar hasta 25 posibles patógenos en una sola muestra.

Tabla 1. Lista de microorganismos detectados por el sistema **SeptiFast**

Gram (-)	Gram (+)	Fungi
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)</i> • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Enterobacter (cloacae / aerogenes)</i> • <i>Proteus mirabilis</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Acinetobacter baumannii</i> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • CoNS (Coagulase negative <i>Staphylococci</i>)* • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Streptococcus spp.**</i> • <i>Enterococcus faecium</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> • <i>Candida tropicalis</i> • <i>Candida parapsilosis</i> • <i>Candida krusei</i> • <i>Candida glabrata</i> • <i>Aspergillus fumigatus</i>

S. epidermidis*, *S. haemolyticus* *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mitis*

La diana de amplificación del sistema son los “espaciadores de transcripción internos” (ITS). Se trata de regiones multicopia no codificantes altamente conservadas en el ADN ribosómico. Las ITS se encuentran entre las secuencias de ADN ribosómico 16s y 23s de todas las bacterias gram positivas y gram negativas y entre las secuencias de ADNr 18s y 5.8s de todos los hongos. Esta zona ofrece una mayor sensibilidad analítica que los genes de copia única ya que existen varios operones en los genomas bacterianos y de hongos. Además, las regiones ITS contienen más regiones específicas que el RNA ribosómico, por lo que resultan más adecuadas para la diferenciación de los microorganismos.

En cada experimento se amplifica de forma simultánea la muestra problema junto con un control negativo (CN) y tres controles positivos (RC) para gram positivos, gram negativos y hongos. Además se amplifica un control interno (CI) añadido en el proceso de extracción, para garantizar la extracción eficiente de la muestra. El CI consta de moléculas sintéticas de ADN de doble cadena con sitios de unión de cebadores idénticos a los de las secuencias objetivo pero con regiones de unión de sondas únicas que permiten diferenciar la amplificación del CI del amplificado real.

Antes de llevar a cabo la amplificación de la región diana, para reducir el riesgo de contaminación con amplicones, se pone en contacto el extracto de ADN con el enzima **uracil-N-glicosilasa**, que reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina, pero no del ADN que contiene desoxitimidina.

3.2.6.1 Amplificación por PCR y detección a tiempo real en el sistema LightCycler® 2.0:

La amplificación y detección a tiempo real se realiza en el instrumento **LightCycler®**: Un sistema automatizado que puede controlar el desarrollo de la amplificación del ácido nucleico diana mediante la medida de la fluorescencia producida en cada ciclo de amplificación. El instrumento realiza la amplificación generando un gradiente de temperaturas mediante corrientes de aire. Al igual que en otros sistemas de PCR a tiempo real, la amplificación y detección del producto final tiene lugar en un sistema cerrado, eliminando la posibilidad de contaminación.²³⁸⁻²³⁹

El eluido final obtenido por ambos sistemas de extracción es sometido a tres reacciones paralelas de PCR diferentes utilizando el kit LightCycler® SeptiFast Mgrade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) Tres alícuotas de 50 µl de la muestra preparada de ADN se añaden a las mezclas maestro correspondientes de cada PCR y se cargan en los capilares del sistema LightCycler, de 100 µl de capacidad. El ADN objetivo se amplifica en las tres reacciones paralelas utilizando el arranque en caliente de Taq polimerasa. Se amplifican las regiones ITS de gram positivos, gramnegativos y hongos, a partir de la unión de cebadores universales o específicos. Las condiciones de amplificación del experimento son las siguientes:

PCR steps	Temperature (°C)	Time	Temperature change (°C/s)
<i>PCR amplification profile</i>			
<i>Preconditioning</i>			
Decontamination	40	5 min	20
Enzyme activation	95	10 min	20
<i>15 cycles pre-amplification</i>			
Denaturation	95	15 s	3.0
Annealing	58	50 s	20
Elongation	72	40 s	3.0
<i>30 Cycles amplification</i>			
Denaturation	95	15 s	3.0
Annealing	50	50 s	20
Elongation	72	40 s	3.0
<i>Melting curve profile</i>			
Denaturation	95	60 s	20
Annealing	40	60 s	20
Melting	80	0 s	0.1

Durante la fase de *annealing* del proceso de amplificación se produce la hibridación de las sondas específicas que emiten fluorescencia que será detectada por el sistema y se lee en uno de los cuatro canales de detección existentes. La sonda incorporada en la mezcla de reacción permite la detección a tiempo real y la diferenciación de cada uno de los microorganismos que detecta el sistema.



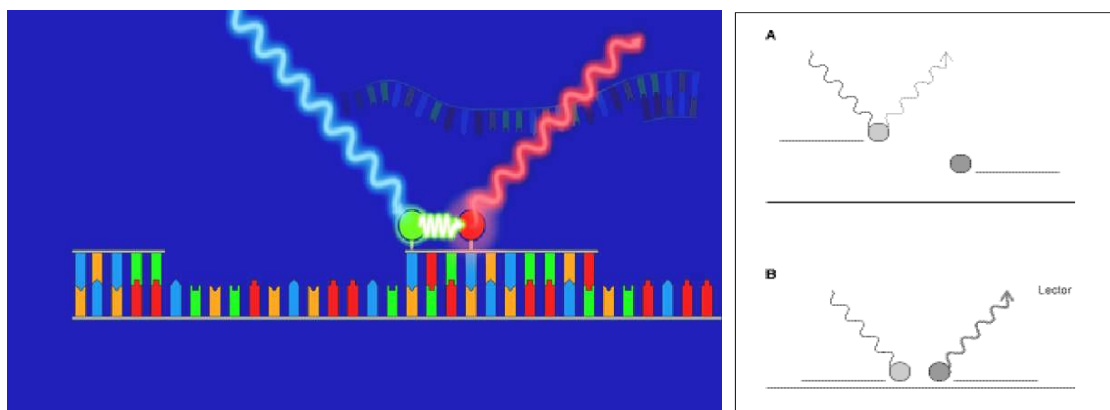
Figura 1. LightCycler ® 2.0

El tipo de sondas utilizadas es el de las denominadas sondas FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) que consisten en sistemas compuestos por pares de oligonucleótidos marcados con sondas moléculas fluorescentes. Cuando dichas sondas se unen a sus secuencias complementarias (adyacentes en el ADN diana) los fluorógenos emiten una señal de fluorescencia en respuesta a la excitación por luz ultravioleta. Esta emisión

puede ser registrada por el fotómetro del LightCycler, y es proporcional al número de moléculas del ADN diana amplificado en cada momento, sobre cuya secuencia hibridan las sondas FRET.

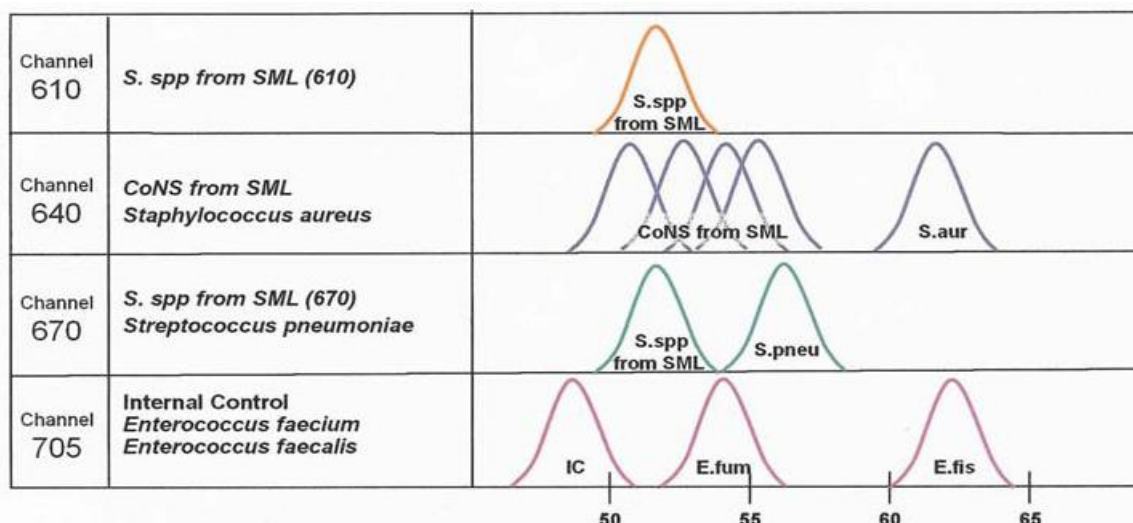
Los marcajes fluorescentes se sitúan en el extremo 3' de una de las sondas y en el extremo 5' de la otra. La hibridación correcta de las sondas sobre sus respectivas secuencias sitúa a los dos fluorocromos próximos entre sí, de manera que la excitación de uno de ellos, el donador, transfiere su energía al aceptor, que a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo.²³⁹ Esta interacción molecular se fundamenta en el fenómeno físico conocido como **transmisión de energía de resonancia de Förster**, y depende de ciertas condiciones favorecedoras como la proximidad (1-10 nm) la orientación y la superposición de los espectros de emisión y de absorción de los fluorógenos.

Figura 3. Sondas FRE

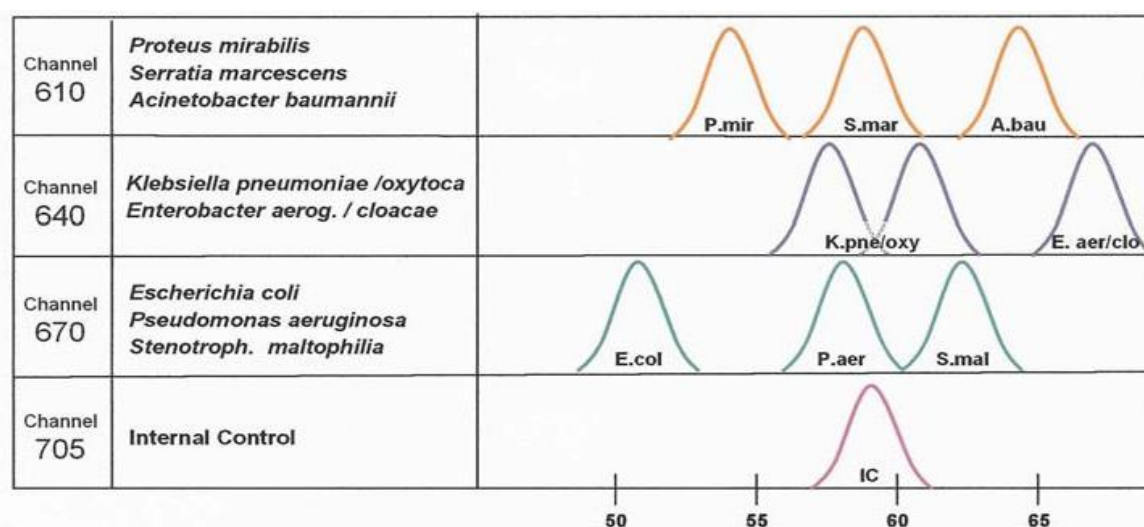


Una vez finalizada la amplificación se genera un análisis de las curvas de disociación entre la sonda y el DNA objetivo. Este análisis se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados con la sonda específica, de esta forma podremos calcular la T_m (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo, de la longitud y composición de sus bases.²³⁸ Por lo tanto, las sondas permitirán diferenciar las cepas por su T_m propia detectada en cada canal. En la Figura 4 se pueden observar la distribución de T_m que corresponden con cada uno de los microorganismos detectados por el sistema y los canales de detección de los mismos y los controles internos.

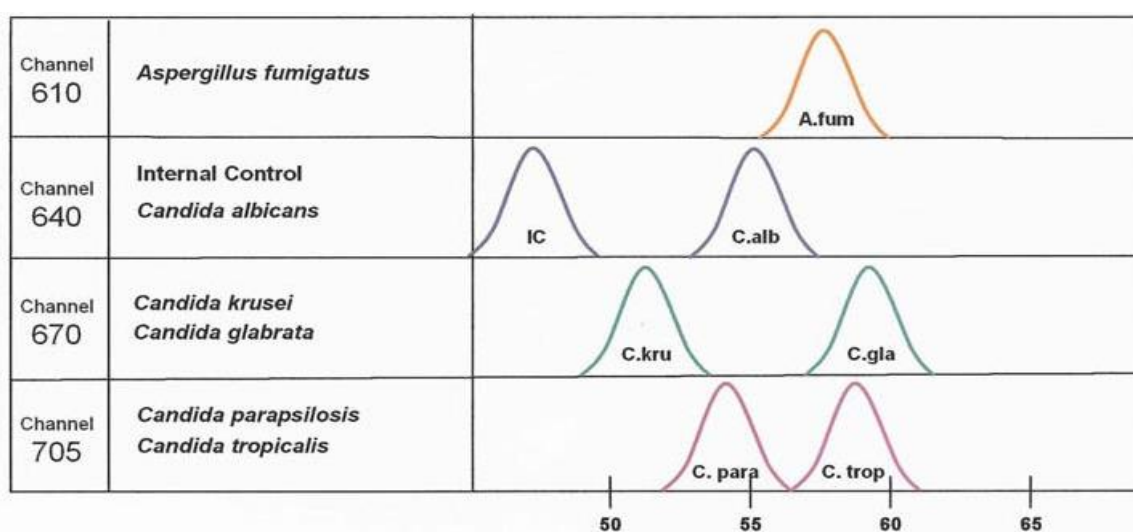
Gram (+)



Gram (-)



Fungi



El análisis de las Tm de las muestras y controles se realiza mediante un software de identificación especial (Software de identificación de SeptiFast: **SIS**) que genera un informe con los resultados.

Las concentraciones bajas de SCN y *Streptococcus* spp. que reflejan el rango de contaminación de flujo de trabajo o de la extracción de la muestra, no se muestran como resultado. Esto supone una ventaja importante con respecto al hemocultivo, ya que permite diferenciar bacteriemias verdaderas de pseudobacteriemias o bacteriemias falsas.²⁴⁰

Para establecer el punto de corte a partir del cual los SCN y *Strep* spp. No son informados por el sistema, contamos con la posibilidad de cuantificar el ADN diana presente en la muestra. En PCR a tiempo real se define como Cp “crossing point” o Ct “threshold cycle” al ciclo en el que se empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. Con concentraciones previamente conocidas que nos permitan establecer una curva patrón, podemos inferir, según el valor de Cp de la muestra, la concentración inicial de ADN presente en la misma. Partiendo de esto, se han realizado estudios ²⁴¹con los que se establecieron los puntos de corte que distinguen las posibles contaminaciones por bacterias gram-positivas a partir de su cuantificación en la muestra de sangre periférica.

3.3 Comparación del sistema Septifast Prep Kit y el sistema MagnaPure Compact en la preparación de ADN

Ambos sistemas de extracción se evaluaron utilizando dos clases de ADN como control, en primer lugar ADN genómico de *E. coli* en forma de ADN estándar y el segundo control consistió en recuperación de ADN genómico de cepas de referencia ATTC. Posteriormente para la evaluación clínica del método automatizado, se analizaron en paralelo 106 muestras de sangre pertenecientes a 72 pacientes ingresados en la UCI del CHUS, que presentaban un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con sospecha de sepsis.

3.3.1 Primer control recuperación de ADN genómico *E.coli*

Como primer control probamos la recuperación de ADN genómico de *E. coli* en forma de ADN estándar para nuestros test (*E. coli* es una de las dianas incluidas en la lista de bacterias que reconoce SeptiFast). Este ADN, suministrado por Sigma-Aldrich (USA) (producto nº D4889) es obtenido por purificación mediante ultracentrifugación por equilibrio de densidad de flotación en gradiente de cloruro de cesio y posee un tamaño aproximado a 16 Kb. Dicho ADN disuelto en buffer TE pH 8 y en alícuotas de diluciones seriadas, se procesó con las técnicas recomendadas por los fabricantes (descritas anteriormente) mediante el *Septifast Prep Kit* y el *MagNA Pure Compact* (MPC) siguiendo con este último dos protocolos diferentes: El protocolo para Lisis externa y el protocolo para Bacterial DNA (comentados en los métodos de extracción de ADN).

Para el ADN estándar se prescindió de la lisis mecánica previa por agitación en *MagNA Lyser*, que en cambio si se realizó en el procesamiento de los otros tipos de muestras, las cuales, a diferencia del ADN estándar, se probaron exclusivamente con el protocolo de Bacterial DNA en el MPC.

3.3.2 Segundo control: recuperación de ADN genómico de cepas referencia ATTC

El segundo control consistió en una mezcla de 20 cepas de referencia ATCC (American type culture Collection) en diferentes concentraciones que para validar la eficacia de la extracción y comprobar la calidad del ADN obtenido se realizaron dos experimentos diferentes:

1. Determinación del ADN recuperado de la mezcla de cepas ATCC preparada en buffer TE pH 8 por medición de fluorescencia con el sistema Qubit y el equipo Quant-iT® (Invitrogen, USA) capaz de cuantificar ADN entre 50 pg/μl y 200 ng/μl sin interferencia de contaminantes comunes como nucleótidos libres, disolventes, detergentes, o proteínas.

2. Ensayo de SeptiFast para comprobar su capacidad de detectar el ADN de *E. coli* y de las 20 cepas de referencia incluidas en la mezcla preparada en sangre total procedente de donantes sanos, después de la extracción por ambos métodos.

Las cepas ATCC caracterizadas por su gran estabilidad genética se corresponden con las dianas que puede identificar *Master list Septifast* si bien es verdad que la técnica identifica 25 microorganismos nosotros solo utilizamos 20 ATCC dado que algunas por su proximidad genética (*K. Pneumoniae/K oxytoca*) se amplifican en el mismo canal y los picos de *melting* correspondientes están muy próximos en ocasiones prácticamente se superponen solo diferenciados por dos picos dentro de la misma curva con intervalos de TM mínimos por lo que no consideramos necesario incluir todas las cepas.

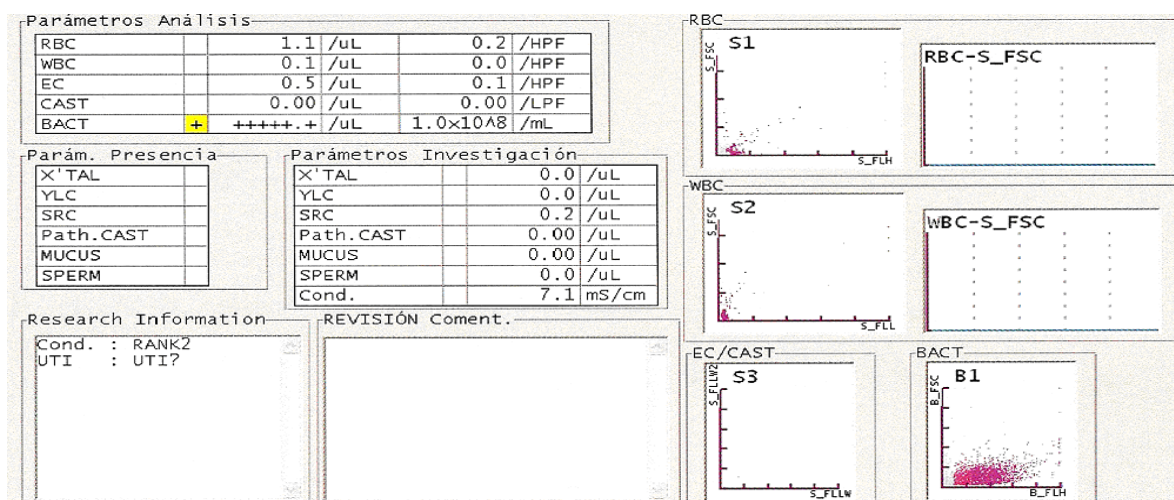
Lista de cepas ATCC utilizadas:

Acinetobacter baumannii (ATCC 19686) *Enterobacter cloacae* (ATCC 13847) *Serratia marcescens* (ATCC 14756) *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 51331) *E. coli* (ATCC 25922) *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063) *Proteus mirabilis* (ATCC 12453) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Staph. epidermidis* (ATCC 12228) *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) *Str. agalactiae* (ATCC 13813) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) *Ent. faecium* (ATCC 35667) *Candida albicans* (ATCC90028) *C. tropicalis* (ATCC 750) *C. parapsilosis* (ATCC 22019) *C. glabrata* (ATCC 1526) *C. krusei* (ATCC 6258) *Aspergillus fumigatus* (ATCC 36607).

3.3.2.1 Recuperación de ADN en bacterias completas en buffer TE pH 8

El genoma de *E. coli* posee $4,6 \times 10^6$ pares de bases con un peso molecular aproximado de $2,5 \times 10^9$ Da, o lo que es lo mismo $4,1514 \times 10^{-9}$ µg. En una suspensión bacteriana 0,5 McFarland con 108 bacterias/ml se alcanzaría una concentración de ADN genómico de *E. coli* próxima a los 0,4 µg/ml (suponiendo que la suspensión estuviese compuesta por una distribución homogénea de bacterias aisladas).

En un intento de medir la eficacia de MPC para extraer ADN procedente de bacterias completas, preparamos múltiples diluciones en buffer TE pH 8 a partir de una suspensión bacteriana concentrada, obtenida de la mezcla de varias colonias de *E. coli* (ATCC 25922) desarrolladas en agar-sangre después de 24 h de incubación a 37°C. La dilución con valor 0,5 McFarland medida en un nefelómetro se usó como referencia para estimar la concentración bacteriana de las demás suspensiones bacterianas. Para confirmar la aproximación en UFC/ml de la suspensión de referencia, esta se midió también por citometría. (Fig. 5)



Las suspensiones bacterianas en TE pH 8 se sometieron a agitación mecánica en *MagNA Lyser* y posteriormente se procesaron para extracción de ADN en MPC siguiendo el protocolo *DNA Bacterial* de igual manera que para las muestras de ADN estándar y las muestras clínicas. La concentración de ADN en los 200 μ l de la solución resultante al final del proceso de extracción se midió con el equipo Quant-iT® para establecer una relación con la cantidad estimada en las suspensiones bacterianas de origen, según los cálculos descritos anteriormente.

3.3.2.2 Ensayo de SeptiFast para comprobar la capacidad de detectar el ADN de las 20 cepas de referencia en sangre con EDTA de donante sano.

Una vez comprobada la extracción de DNA de bacterias completas en buffer TE pH 8 y establecido el cálculo aproximado de la diluciones se procede a comprobar la capacidad del sistema para diferenciar los 20 patógenos incluidos en el test tras la extracción por ambos métodos, se determinó mediante el uso de cepas de referencia ATCC (American type culture Collection), que se caracterizan por su gran estabilidad genética. Se realizaron diluciones *seriadas* a partir de una dilución matriz que contiene 10^8 UFC/ml de cada microorganismo (turbidez 0.5 McFarland), inoculados en sangre de donantes sanos, obteniéndose así diluciones con las siguientes concentraciones: $25 \cdot 10^5$ UFC/ml, $5 \cdot 10^3$ UFC/ml, 50 UFC/ml, 5 UFC/ml, 2.5 UFC/ml y 0.5 UFC/ml. que se procesaron por ambos métodos MagNa Pure Compact. SFM y SeptiFast Mgrade Extrac. Manual.

3.3.3 Cálculo control interno

Finalmente era preciso conocer la cantidad necesaria de C.I. que debíamos de añadir a cada muestra. Hemos probado 3, 4 y 5 al sobre los 400 al de muestra total (4 µl representan la misma proporción 1:100 que los 10 µl que se incluyen sobre 1 ml de sangre en la técnica manual) Los tres volúmenes permiten detectar el C.I. al final de la PCR sin competir con las otras dianas de amplificación, así que hemos optado por usar 4 µl en orden de mantener la proporción de la técnica original.

3.4 Estudio de interferencia del ADN genómico con la extracción de ADN bacteriano mediante MagNA Pure Compact

Generalmente los pacientes con sepsis presentan leucocitosis en sangre periférica como consecuencia del propio proceso inflamatorio que define el SRIS. El exceso de ADN genómico presente en estas muestras podría dificultar la recuperación del ADN bacteriano en la baja carga de algunas bacteriemias, que se vería “enmascarado” por aquel después de la lisis celular. Para ver este posible efecto hemos diseñado dos experimentos que nos permiten evaluar la extracción conjunta de ambos tipos de ADN y comprobar la variación causada en la detección del bacteriano mediante la PCR *SeptiFast* después de la mezcla con cantidades crecientes de ADN genómico.

3.4.1 Mezcla de ADN estándar *E.coli* con ADN placenta

El primero de ellos consistió en la mezcla del ADN estándar de *E.coli* suministrado por Sigma-Aldrich (USA) (producto nº D4889) en una cantidad constante de 4 µl (de una dilución en buffer TE pH 8 a 5 µg/ml de concentración) con ADN de placenta humana, suministrado liofilizado por Sigma-Aldrich (USA) (producto nº D3287). Este producto se obtiene por extracción con fenol-cloroformo, precipitación en etanol y sonicación para obtener fragmentos de cadena sencilla de 564 a 831 pares de bases. Con el ADN placentario preparamos una primera concentración de 190 µg/ml (cantidad que duplica la concentración de ADN en muestras de sangre con leucocitosis moderadas) y sucesivas diluciones 1:2 con buffer TE pH 8, hasta alcanzar 1:16 de la primera (12 µg/ml). Todas estas diluciones se

sometieron a la extracción automática *MagNA Pure Compact* siguiendo el protocolo que hemos elegido para las muestras clínicas de *SeptiFast*: el *DNA Bacterial Protocol* que parte de 400 µl de volumen de muestra y finaliza con 200 µl de elución. Inmediatamente antes de introducir la gradilla con las distintas concentraciones de ADN en el *MagNA Pure Compact*, añadimos a cada una 4 µl de la dilución de ADN de *E.coli* preparada como se indicó antes. Lo que hace una cantidad total de 0,02 µg de ADN de *E.coli* por muestra.

La concentración de ADN resultante del proceso de extracción de cada muestra, se midió por fluorescencia con el sistema Qubit y el equipo Quant-iT[®] (Invitrogen, USA).

3.4.2 Mezcla de ADN estándar *E.coli* en sangre total con recuento periférico de leucocitos normal

El segundo experimento de interferencia, se llevó a cabo a partir de una muestra de sangre total con EDTA con un recuento leucocitario en el límite de la normalidad, con 10.710 leucocitos/µl sin desviación izquierda, de un sujeto asintomático y sin patología infecciosa. Una vez lisada mecánicamente en *MagNA Lyser* a 7.000 r.p.m. durante 70 sg, la sangre fue diluida 1:2, 1:4 y 1:8 en TEB pH 8. Se prepararon alícuotas de 400 µl de cada una de las diluciones y de la sangre total en la gradilla del *MagNA Pure Compact* siguiendo las instrucciones del fabricante, e inmediatamente antes de introducir la gradilla en el instrumento para efectuar la extracción de ADN, se añadieron 4 µl del ADN de *E.coli* sobre cada una de las muestras de sangre, en las condiciones descritas con anterioridad. El protocolo de extracción utilizado fue el mismo que para el experimento de interferencia con ADN de placenta humana y para las muestras clínicas de *SeptiFast*. Finalmente, se midió la concentración de ADN obtenida de cada una de las muestras con el sistema Qubit y el equipo Quant-iT.[®]

Para comprobar la interferencia del ADN genómico en la recuperación y en la detección por PCR del ADN de *E.coli* de las muestras anteriores, fue necesario diseñar un ensayo de *SeptiFast* que nos permitiera hacer la cuantificación absoluta del ADN de *E.coli* amplificado a partir de dichas muestras.

El software 4.05 del *LightCycler 2.0* realiza automáticamente el cálculo del ciclo umbral de la PCR (C.P. o puntos de corte) a partir del crecimiento exponencial de la medida

de fluorescencia de las gráficas de amplificación. Los C.P. nos permiten estimar la cantidad de molde original en la reacción de PCR obtenida con cada una de las muestras. No obstante, el programa “Macro” instalado en el LightCycler para la interpretación de *SeptiFast* posee 15 ciclos de amplificación previos a la lectura de fluorescencia. Estos primeros ciclos poseen una alta temperatura de hibridación (58°C) que aumenta la especificidad de la reacción pero que no es adecuada para la hibridación de las sondas FRET. La lectura de fluorescencia no tiene lugar hasta los 35 ciclos siguientes cuando ya se han realizado múltiples copias del ADN diana de la PCR. Es entonces, cuando la temperatura de hibridación desciende a 50 °C y las sondas reconocen sus secuencias complementarias en el producto de amplificación, cuando comienza la cuantificación en el programa de *SeptiFast*; cuantificación que resulta útil para las bajas cargas de ADN de las muestras clínicas en las que es procedente (especialmente cuando se trata de reconocer las contaminaciones) pero que no permite el cálculo tan preciso cuando la concentración de ADN es mayor. Por lo tanto, decidimos modificar el programa de manera que la fluorescencia pudiese ser medida desde el primer ciclo, con hibridación a 50°C, y completando un total de 45 ciclos antes de la curva de *melting*. La teórica pérdida de especificidad con menor temperatura de hibridación en los 15 primeros ciclos no es relevante en nuestra prueba, dado que el ADN objeto ha sido añadido artificialmente por nosotros mismos sobre una muestra control sin bacteriemia.

Esta variación del programa nos ha permitido obtener el ciclo umbral de las curvas de amplificación y estimar, al menos comparativamente, la cantidad de ADN de *E.coli* recuperada en las distintas extracciones.

3.4.3 Evaluación clínica de los dos métodos de extracción de ADN

Finalmente, se analizaron 106 muestras de sangre de 72 pacientes ingresados en la UCI del CHUS con sospecha de sepsis, entre febrero y junio del 2008. Las muestras de sangre trataron del mismo modo que las estudiadas en el primer grupo de pacientes. Todas las muestras se procesaron en paralelo por los dos métodos de extracción empleados en el trabajo. En la tabla 3 se reflejan las características clínicas de estos pacientes.

Tabla 3. Características clínicas de los 72 pacientes de UCI

Nº. Pacientes	72
Nº. Muestras	106
Edad media (rango)	64(21-92)
Sexo, no.(%)	
M	53(26)
F	19(74)
Mortalidad, (%)	37,5
Enfermedad de base, nº pacientes	
Respiratoria	18
Cardiovascular	18
Alcoholismo	10
Oncológica	6
Digestiva	6
Psiquiátrica	4
Neurológica	2
Varias causas	6
Otras causas	2
APACHE II	
0-4	0
5-9	2
10-14	9
15-19	15
20-24	12
25-29	15
30-34	11
>34	8

Al igual que en el primer estudio clínico, se tomaron simultáneamente muestras para el cultivo de sangre (FN/FA BacT-Alert, Biomerieux, France) (n=102) y otras localizaciones, entre ellas aspirados bronquiales (n= 15), catéteres (n=3), esputos (n=4), Líquidos ascíticos (n=2), orina (n=4), exudados de heridas (n=3), líquidos pleurales (n=1) y líquidos sinoviales (n=1); procesando cada una de ellas de forma adecuada según los protocolos del servicio.

Las botellas de hemocultivo en las que el instrumento *Bact-Alert* detectaba crecimiento, se extraían para preparar una tinción de Gram y hacer un pase de cultivo a los medios sólidos oportunos en placas de agar. Una vez obtenidas las colonias de crecimiento, se procedía a su identificación mediante sistemas automáticos como Vitek II (Biomerieux, France) o por otras

técnicas bioquímicas de identificación apropiadas. De la misma manera, los aislamientos conseguidos con el procesamiento de las otras muestras, también fueron seguidos de la tinción de Gram y de los correspondientes métodos apropiados para su identificación.

3.5 Análisis estadístico

Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad del test LightCycler® SeptiFast se tuvieron en cuenta los datos obtenidos de los cultivos microbiológicos convencionales, entendiéndose como verdadero positivo de la prueba aquel que se ha confirmado mediante el crecimiento del mismo microorganismo que el detectado por el test en hemocultivo y/o en el cultivo de cualquier otra muestra microbiológica.

El nivel de concordancia se calculó mediante el índice Kappa de Cohen, considerándose como “baja concordancia” los valores entre 0.21 y 0.40, “moderada” si está entre 0.40 y 0.60 y los valores entre 0.81 y 1.00 “concordancia perfecta”; se establece así el nivel de concordancia entre el resultado del test LightCycler® SeptiFast y la microbiología convencional.

Para conocer la significación estadística entre la positividad del test por ambos sistemas de extracción se establece el valor de P realizando tablas de contingencia 2·2, el valor de P se calculó usando el test de McNemar. Para el cálculo se utilizó el programa SPS 1.5 (SPS, Chicago, IL). El nivel de significación estadística se define como $p < 0.5$.

3.6 Determinación del polimorfismo C-159-T en el promotor del gen del receptor CD14

CD14 se expresa constitutivamente en la superficie de monocitos, macrófagos y polimorfonucleares, pero existe también una forma soluble presente en el suero, que sería capaz de actuar sobre tejidos cuyas células no lo expresan en su membrana. Este receptor posee una alta afinidad por el LPS de bacterias gram-negativas además de por otros productos microbianos y juega un papel fundamental en el reconocimiento de antígeno, ejerciendo una

acción coadyuvante con TLR-2 y TLR-4 de gran importancia en la inmunidad innata y en la generación de la respuesta inflamatoria.

Existen diversos estudios, algunos con resultados contradictorios, sobre el papel de este polimorfismo en la sepsis²⁴²⁻²⁴³ y en otros procesos patológicos (Ukelbach et al. observan una fuerte asociación entre el riesgo de infarto de miocardio y el genotipo TT incluso en pacientes sin otros factores de riesgo como el tabaquismo o la hipertensión) que pueden influir en la evolución de pacientes críticos y por tanto en su tasa de mortalidad.²⁴⁴

Nosotros hemos determinado este polimorfismo en los pacientes de los dos primeros grupos de nuestro trabajo en busca de una posible relación entre esta diferencia genética con la susceptibilidad a la infección o con la respuesta inmune, que pueden determinar las complicaciones y la mortalidad en estos pacientes con sepsis.²⁴⁵

3.6.1 Amplificación a partir de ADN genómico y análisis de restricción

El estudio del SNP se realizó a partir de las mismas muestras de ADN obtenidas para *SeptiFast* en los dos primeros grupos de pacientes, mediante la amplificación de la región 5' del gen de CD14 incluida en el intervalo entre -513 bp y -17 bp desde el lugar de inicio de transcripción con los *primers* 5'-GTGCCAACAGATGAGGTTTCAC-3' y 5'-GCCTCTGACAGTTTATGTAATC-3' (Invitrogen).²⁴⁶ La mezcla de reacción se preparó con los reactivos del kit para PCR *Access* (Promega) en 50 µl totales por muestra incluyendo 27 µl de H₂O, 10 µl 5X del buffer de reacción incluido en el kit, 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 2 µl de cada primer 10 µM, 2 µl de MgSO₄ 25 mM y 1 µl Tfl polimerasa, sobre los que se añadieron 5 µl de ADN de la muestra del paciente. La reacción tuvo lugar durante 40 ciclos de amplificación de 94 °C 30sg, 50 °C 1 min. y 68 °C 2 min., precedidos de una incubación de 2 min. a 94 °C y finalizando con 7 min. a 68 °C en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems)

Los productos de 497 bp obtenidos se sometieron a un análisis de restricción con AVA II (New England Biolabs) que reconoce la secuencia GGTC presente sólo en los portadores del alelo CD14/159-T. De esta manera, en la electroforesis se pueden obtener tres bandas de 144, 353 y 497 bp para los heterocigotos CT, dos bandas de 144 y 353 bp para los

homocigotos TT o una sola banda de 497 bp, del producto sin digerir, para los homocigotos CC²⁴⁶

3.6.2 PCR en tiempo real y *melting peaks* para determinación el SNP

El SNP se pudo detectar también mediante el análisis de las curvas de *melting* de los productos de amplificación resultantes de la PCR a tiempo real. Para ello se utilizaron los siguientes *primers* y sondas FRET de hibridación,²⁴⁵ capaces de reconocer la secuencia variable del promotor (Tib Molbiol. Berlin, Germany).

Primers: sense 5'-GGTGCCAACAGATGAGGTTTAC-3'

antisense 5'-CTTCGGCTGCCTCTGACAGTT-3'

Sondas:

LC-640 – 5'-TTCCTgTTACggCCCCCCT -3' – PH

5'-ggAgACACAgAACCCTAgATgCCCTgcA-3' – FL

La reacción, se realizó en capilares de 20 µl del LightCycler 2.0 con 5,3 µl de H₂O; 0,5 µl de *primers* (10 µM) 1 µl y sondas (3 µM) y 3 µl de Fast Start DNA-Plus Master HybProbe (Cat N° 03 515 575 001 – Roche Applied Science – Roche Diagnostics GmbH. Mannheim, Germany) a los que se añadieron 3,7 µl de ADN de las muestras de los pacientes.

La programación de la PCR consistió en 9 min de preincubación a 95°C, seguidos de 45 ciclos de 2 seg a 95°C, 10 seg a 55 °C y 11 seg a 72°C, con adquisición de fluorescencia en modo *single* durante la fase de hibridación a 55°C. Al final de los ciclos de amplificación se realiza una *melting curve* con 5 seg de desnaturalización a 95°C y 10 seg de hibridación a 45°C; seguidos de un aumento de temperatura a razón de 0,2 °C/seg hasta los 85°C con adquisición de fluorescencia en modo continuo. El software 4.0 del LightCycler calcula los *melting peaks* que nos permiten diferenciar la secuencia amplificada.

3.7 Diagnóstico de endocarditis infecciosa a partir de tejido valvular

En un considerable número de casos con sospecha clínica de endocarditis infecciosa (EI) que oscila entre el 2,5% y el 31%, la etiología microbiológica no puede ser confirmada por el hemocultivo. El crecimiento del microorganismo causante a menudo no es posible debido a la antibioterapia previa, a la recogida inadecuada o inoportuna de las muestras, o a la presencia de gérmenes exigentes y de crecimiento lento. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de las técnicas de diagnóstico molecular ha permitido elaborar alternativas más capaces de alcanzar este diagnóstico etiológico. El ADN bacteriano es detectable mediante PCR y persiste de forma estable en el tejido valvular durante largos periodos de tiempo, sin que se haya podido determinar con certeza si la amplificación de estas secuencias de ADN es predictiva de un proceso infeccioso activo, aún cuando las bacterias no sean viables por cultivo.

Las técnicas propuestas consisten principalmente en PCR de amplio espectro dirigidas a regiones del genoma bacteriano codificadoras del rRNA 16S, seguidas de la secuenciación de los productos de amplificación, las cuales ofrecen mayor sensibilidad y especificidad que los cultivos convencionales.²⁴⁷⁻²⁴⁸

A pesar del buen rendimiento de estos procedimientos, su complejidad, su excesiva laboriosidad y la necesidad de personal técnico altamente especializado, dificultan su introducción como técnica de rutina en muchos laboratorios de Microbiología Clínica. En nuestro laboratorio hemos ensayado una alternativa que podría ser útil para la mayoría de los diagnósticos de endocarditis infecciosa, fácil de asimilar como método de rutina y que reduce el tiempo de diagnóstico a tan sólo 4 h. Se trata de la aplicación de la técnica LightCycler SeptiFast® como diagnóstico molecular de las endocarditis con cultivo negativo, a partir del tejido valvular.

Entre agosto de 2007 y septiembre de 2009 se estudiaron 15 pacientes (11 varones y 4 mujeres) con EI activa sometidos a cirugía valvular. La media de edad fue de 70,2 años (intervalo 57 – 82) Todos presentaban EI definida según los criterios de Duke modificados²⁴⁷ localizada sobre válvula nativa izda. (6 casos) prótesis valvular (8 casos) y válvula tricúspide (1 caso).

Antes de ser remitidos para cirugía se habían extraído hemocultivos en distintos servicios hospitalarios, que resultaron positivos en 13 casos y negativos en 2. Todos los pacientes habían recibido tratamiento antiinfeccioso entre 24 h y 82 días antes, sin completar una pauta correcta.

Durante la evaluación preoperatoria, realizada entre 1 y 24 días después del hemocultivo, se extrajo sangre para estudio mediante *SeptiFast*, y en la intervención quirúrgica, se introdujo una muestra de tejido valvular con vegetaciones o sólo vegetaciones, en el caso de prótesis, en un recipiente estéril libre de ADN y sin aditivos para la PCR.

Un fragmento del tejido fue remitido para cultivo convencional en agar sangre, agar proteosa (CO₂ 5%) agar Sabouraud, agar Schaedler (anaerobiosis) y caldo tioglicolato.

La identificación de los microorganismos aislados se llevó a cabo mediante el sistema *Vitek 2* (*bioMerieux*, Nancy l'Etoile, Francia).

3.7.1 Extracción de ADN de vegetaciones de válvulas cardíacas con el sistema automático MagNA Pure Compact

En condiciones estériles 20mg de una vegetación valvular se homogenizan en 750 µl de Tissue-Lysis buffer (ROCHE 1 796 828 High Pure PCR Template Prep kit) mediante lisis mecánica con bolas de cerámica y vidrio en el agitador MagNALyser® (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany) a 7000 rpm 70 seg. Tras sedimentación durante 10 min. Se recogen 400 µl del sobrenadante y se dispensan en un tubo para muestras, colocado en su correspondiente posición de la gradilla del MagNA Pure Compact. Una vez preparados los reactivos según las indicaciones del fabricante, e inmediatamente antes de comenzar el protocolo de extracción, añadimos a la muestra 4 µl 1 del Control Interno de *SeptiFast*®. Finalmente seleccionamos el programa para extracción de ADN bacteriano con la opción de 400 µl de volumen de muestra y 200 µl de volumen de elución. El instrumento realiza una extracción automática de ADN en 30 min. Mediante cromatografía de adsorción en partículas magnéticas y en condiciones de esterilidad, sin requerir más que una mínima manipulación de la muestra.

4.-RESULTADOS



4.1 Análisis comparativo del rendimiento de SeptiFast (ROCHE) con los procesos de diagnóstico habitual utilizados en el laboratorio de microbiología

4.1.1 Comparación del SeptiFast con Hemocultivo.

La identificación de microorganismos obtenida mediante la PCR *SeptiFast* en sangre periférica se comparó con el resultado del hemocultivo en las mismas muestras y con la revisión de los procedimientos convencionales de diagnóstico microbiológico a partir de otras muestras de estos mismos pacientes. El cálculo de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia se realizó, en principio, sobre los dos primeros grupos de pacientes incluidos en el estudio, cuyas características poblacionales, diagnósticos de inicio y lugares de origen de la sepsis (cuando podía ser conocido) eran similares. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad, sexo o índices de riesgo entre los dos grupos de pacientes. (Tabla 1)

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de los dos grupos de pacientes.

Control	LCS	p	
	<u>N=54</u>	<u>N=48</u>	
Edad	M 65.3 ± 14.7	64.4 ± 12.9	ns
Sexo			
Masculino	45	35	
Femenino	9	13	
Diagnóstico inicial			
Abdomen agudo	11	9	
Cirugía	2	2	
Cirugía abdominal programada	4		
Neumonía	1	7	
Pancreatitis	9	5	
Lesión en SNC	4	20	
Politraumatismo / craneal	20	2	
Trauma	3	1	
Cirugía cardíaca	1		
Diagnóstico de condición de sepsis			
Peritonitis	11	9	
Neumonía	32	28	
Meningitis	1		
Endocarditis	2	2	
Mediastinitis	2	2	
Heridas / Infec. tejidos blandos	6	6	
Infec. Urinaria	1		
Índices de riesgo			
APACHE II	17.5 ± 6.3	16.8 ± 5.1	ns
SOFA	8.8 ± 5.0	8.1 ± 4.1	ns

Para dichos cálculos, en primer lugar, se tomaron como referencia los resultados obtenidos por el hemocultivo, si bien hemos de tener en cuenta sus limitaciones en cuanto a sensibilidad para establecer el diagnóstico etiológico de la sepsis.²⁴⁹

La evaluación de ambos grupos se efectuó separadamente y en conjunto, estableciendo además dos modos de cálculo en cada caso: Por un lado comparando cada una de las determinaciones de SeptiFast con la correspondiente toma del hemocultivo y por otro analizando el seguimiento de cada paciente, como un caso, a lo largo de su estancia en la UCI y observando la eficacia de las dos técnicas para demostrar la presencia de microorganismos en algún momento de la evolución del cuadro.

El *software* de SeptiFast realiza un análisis semi-cuantitativo para las PCR de gram-positivos en los canales de lectura donde se identifican los *SCN* y los *Streptococcus spp.* con objeto de reconocer las posibles contaminaciones producidas por estas bacterias. Cuando se amplifica ADN de alguna de estas especies, el informe de resultados del sistema de identificación de SeptiFast (SIS) no refleja su presencia a no ser que el punto de corte de la curva de amplificación se encuentre por debajo de 35 ciclos, interpretando que la amplificación es causa de una falsa bacteriemia cuando se supera este umbral. De igual modo, hemos considerado que los hemocultivos con estos aislamientos son reflejo de contaminaciones, salvo aquellos en los que se obtuviese el crecimiento de la misma cepa en distintas tomas de muestra.

En las tablas 2, 3 y 4 podemos ver los resultados de la comparación de SeptiFast con Hemocultivo atendiendo a cada una de las determinaciones realizadas en paralelo para los dos grupos de pacientes por separado (tablas 2 y 3) y para los dos grupos en conjunto (tabla 4) después de haber descartado los casos sospechosos de falsa bacteriemia.

Tabla 2. SeptiFast / Hemocultivo Grupo 1º

SeptiFast / Hemocultivo Grupo 1º	Intervalos de confianza	inferior	superior
Sensibilidad	42,1	20	66
Especificidad	84,12	78	88
Valor Predictivo Positivo	17,77	8	32
Valor Predictivo Negativo	94,68	90	97
Prevalencia	7.53		
Ratio Prob. Test Positivo	2.65	1,44	4.85
Ratio Prob. Test Negativo	0.688	0,467	1,01
<u>Kappa</u>	0.161		

Tabla 3. SeptiFast / Hemocultivo Grupo 2º

SeptiFast / Hemocultivo Grupo 2º	intervalos de confianza	inferior	superior
Sensibilidad	45,45	16	76
Especificidad	84,05	73	91
Valor Predictivo Positivo	31,25	11	58
Valor Predictivo Negativo	90,62	80	96
Prevalencia	13,75		
Ratio Prob. Test Positivo	2,85	1,22	6,63
Ratio Prob. Test Negativo	0,648	0,374	1,12
<u>Kappa</u>	0,247		

Los resultados son similares en ambos grupos y por lo tanto en la tabla 4, que recoge los valores obtenidos por los dos grupos en conjunto, no se aprecian variaciones significativas.

Tabla 4. SeptiFast / Hemocultivo Los 2 Grupos

SeptiFast / Hemocultivo Los 2 Grupos	Intervalos de confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	43,33	25	62
Especificidad	84,1	79	88
Valor Predictivo Positivo	21,31	11	33
Valor Predictivo Negativo	93,72	90	96
Prevalencia	9,03		
Ratio Prob. Test Positivo	2,72	1,67	4,42
Ratio Prob. Test Negativo	0,67	0,49	0,92
<u>Kappa</u>	0,187		

En cuanto al cálculo de resultados para el estudio del seguimiento de cada paciente como un caso, si que se observan algunas diferencias en la sensibilidad y especificidad obtenidas en ambos grupos al confrontar SeptiFast con Hemocultivo, como se aprecia en las siguientes tablas.

Tabla 5

SeptiFast / Hemocultivo Grupo 1° (seguimiento casos)	Intervalos de confianza	inferior	Superior
Sensibilidad	72,22	46	90
Especificidad	72,22	54	85
Valor Predictivo Positivo	56,52	34	76
Valor Predictivo Negativo	83,87	66	94
Prevalencia	33,33		
Ratio Prob. Test Positivo	2,59	1,42	4,73
Ratio Prob. Test Negativo	0,384	0,177	1,83
<u>Kappa</u>	0,415		

SeptiF SeptiFast / Hemocultivo Grupo 2° (seguimiento casos)

SeptiFast / Hemocultivo Grupo 2° (seguimiento casos)

Tabla 6

SeptiFast / Hemocultivo Grupo 2° (seguimiento casos)	Intervalos de confianza	inferior	superior
Sensibilidad	38,46	13	68
Especificidad	79,16	57	92
Valor Predictivo Positivo	50	18	81
Valor Predictivo Negativo	70,37	49	86
Prevalencia	35,13		
Ratio Prob. Test Positivo	1,84	0,65	5,22
Ratio Prob. Test Negativo	0,777	0,482	1,25
<u>Kappa</u>	0,186		

Tabla 7. SeptiFast / Hemocultivo Los 2 Grupos (seguimiento casos)

SeptiFast / Hemocultivo Los 2 Grupos (seguimiento casos)	Intervalos de confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	58,06	39	75
Especificidad	75	62	85
Valor Predictivo Positivo	54,54	36	71
Valor Predictivo Negativo	77,58	64	87
Prevalencia	34,06		
Ratio Prob. Test Positivo	2,32	1,36	3,94
Ratio Prob. Test Negativo	0,559	0,36	0,86
<u>Kappa</u>	0,325		

La sensibilidad de *SeptiFast* es mayor en el primer grupo, probablemente como consecuencia de un seguimiento más prolongado y con mayor número de determinaciones.

4.1.2 Comparación de los resultados de *SeptiFast* con los obtenidos por el conjunto de procesamiento microbiológicos convencionales

Si comparamos los resultados de *SeptiFast* con los obtenidos por el conjunto de los procesamiento microbiológicos realizados a las distintas muestras de cada paciente además de los hemocultivos, también podemos encontrar una diferencia favorable al primer grupo, que puede ser debida a la mayor continuidad del estudio en estos pacientes.

Tabla 8. *SeptiFast* / Hemocultivo + Micro. Grupo 1º (seguimiento casos)

<i>SeptiFast</i> / Hemocultivo + Micro. Grupo 1º (seguimiento casos)	Intervalos de confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	52,77	35	69
Especificidad	94,44	72	99
Valor Predictivo Positivo	95	75	99
Valor Predictivo Negativo	50	32	67
Prevalencia	66,66		
Ratio Prob. Test Positivo	9,49	1,37	65,42
Ratio Prob. Test Negativo	0,5	0,347	0,71
<u>Kappa</u>	0,444		

Existe una discrepancia en el caso nº 24 en el que se amplificó *S. maltophilia* en una de las PCR y sin embargo no fue aislada en cultivo, pero en los hemocultivos de este paciente si crecieron *SCN* en las dos tomas recogidas en sendas ocasiones y en una toma más de dos correspondientes a otro hemocultivo. Al revisar las determinaciones de *SeptiFast* de este caso, hemos advertido la amplificación de ADN de *SCN* en concordancia con los hemocultivos positivos, aunque por debajo del punto de corte establecido para que el SIS informara de su detección. Si interpretásemos como contaminación la presencia de *SCN* en los hemocultivos de este paciente, siguiendo el criterio de *SeptiFast*, la tabla anterior sería válida, pero si consideramos también como posible contaminante a la *S. maltophilia* (dada su concurrencia con la amplificación en baja carga de *SCN* y que con relativa frecuencia este microorganismo se presenta como tal) entonces la tabla quedaría como sigue, alcanzando una especificidad y un valor predictivo positivo de 100%.

Tabla 9. SeptiFast / Hemocultivo + Micro. Grupo 1° (seguimiento casos) modificada

SeptiFast / Hemocultivo + Micro. Grupo 1°	Intervalos de confianza	Superior	Inferior
Sensibilidad	52,77	35	69
Especificidad	100	81	100
Valor Predictivo Positivo	100	82	100
Valor Predictivo Negativo	51,42	33	68
Prevalencia	70,37		
Ratio Prob. Test Positivo	NaN		
Ratio Prob. Test Negativo	0,472	0,334	0,66
<u>Kappa</u>	0,455		

4.2 Modificación de la técnica de extracción de ácidos nucleicos de sangre periférica para PCR LightCycler – SeptiFast

Una de las ventajas principales que las técnicas moleculares pueden aportar al diagnóstico de la sepsis es la facilitación del inicio precoz de una terapia antibiótica dirigida y adecuada, condición indispensable para reducir la alta mortalidad de estos cuadros.²⁵⁰⁻²⁵¹ En la literatura científica se han comunicado tasas de mortalidad de 31,4% en pacientes con tratamiento inadecuado que desarrollan infección nosocomial en la UCI.²⁵²

LightCycler-SeptiFast Mgrade (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany) es capaz de detectar 25 de las especies de bacterias y hongos de mayor relevancia en la etiología de la sepsis y las infecciones nosocomiales. Estas especies causan aproximadamente el 90% de todas las bacteriemias, e incluyen entre ellas a las que reciben un tratamiento inadecuado con mayor frecuencia y a las que causan infecciones cuya terapia resulta especialmente complicada.²⁵³⁻²⁵⁴

Al igual que en la mayoría de los métodos moleculares, en este test se sigue un orden de trabajo en tres fases diferenciadas: extracción, amplificación / detección (PCR en tiempo real) y análisis de datos. La separación de ácidos nucleicos del protocolo de SeptiFast Mgrade Prep Kit consiste en sucesivos pasos de lisis mecánica y enzimática, filtración en columnas con fibra de vidrio, lavados, incubaciones breves, centrifugaciones y elución final; constituyendo un procedimiento laborioso con múltiples manipulaciones, que exige una alta

concentración por parte de personal especializado, el cual ha de ofrecer una dedicación constante y exclusiva a esta labor durante las 3,52 horas que consume.

Nuestra propuesta consiste en modificar la técnica de extracción convencional recomendada por el fabricante por un sistema rápido y automático basado en nanopartículas magnéticas, capaz de reducir el tiempo de separación de ácidos nucleicos a 34 min. aproximadamente. El *MagNA Pure Compact nucleic acid isolation kit I* (cat. 03 730 964 001) (Roche Applied Science, Penzberg, GmbH) además de conseguir la reducción del tiempo total de la PCR *SeptiFast* de 6,54 horas a 3,57 disminuye la posibilidad de errores y de contaminación como consecuencia de la excesiva manipulación necesaria con el método manual convencional. Este considerable acortamiento de todo el proceso repercute en una mayor prontitud del informe y en la toma de decisiones terapéuticas más tempranas, sin que suponga una pérdida en la sensibilidad del método, como veremos a continuación.

Nuestra evaluación se centrará en dos aspectos fundamentales: En primer lugar, determinar el rendimiento en la recuperación del ADN presente en la muestra original siguiendo dos de los protocolos disponibles en el sistema automático *MagNA Pure Compact* (MPC) y en segundo, comprobar la funcionalidad del ADN obtenido, o lo que es lo mismo, la posibilidad de identificar las dianas de ADN incluidas en la lista maestra que define el espectro de *SeptiFast*.

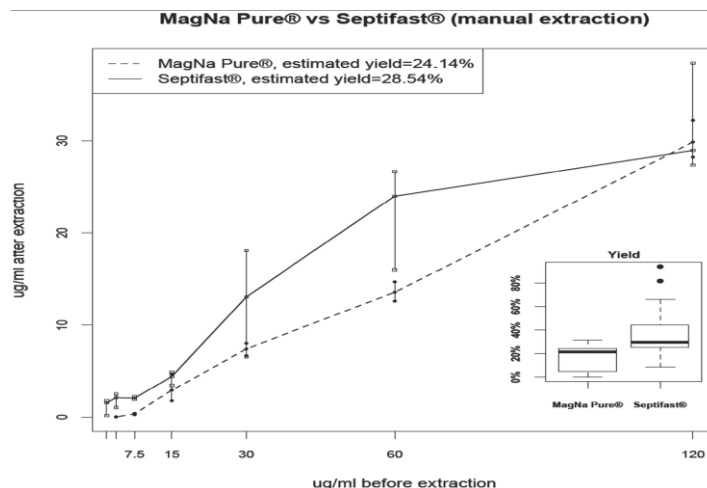
4.2.1 Rendimiento de las dos técnicas para recuperación de ADN control

Para evaluar la capacidad de extracción de ADN de ambos métodos hemos utilizado un estándar de ADN de *E. coli* (Sigma-Aldrich (USA)) dado que este microorganismo es uno de los incluidos en la lista objeto de la PCR *SeptiFast* y por lo tanto posee la ventaja adicional de que una vez recuperado, puede ser detectado con esta técnica molecular.

La capacidad de extracción se determinó midiendo la concentración del ADN obtenido a partir de diluciones seriadas procesadas por ambos métodos partiendo de 400 µl de volumen inicial. Este volumen viene condicionado por los procedimientos del MPC en sus protocolos para “*Total NA Plasma*” y “*Bacterial DNA*”, que finalizan respectivamente con un volumen de elución de 100 µl y 200 µl, mientras que la técnica manual concentra el ADN en 300 µl de volumen final.

La recuperación fue similar en los dos sistemas hasta el límite de adsorción de ambas superficies: 24,14% para MPC versus 28,54 % para SeptiFast Mgrade Prep Kit. (Fig.3).

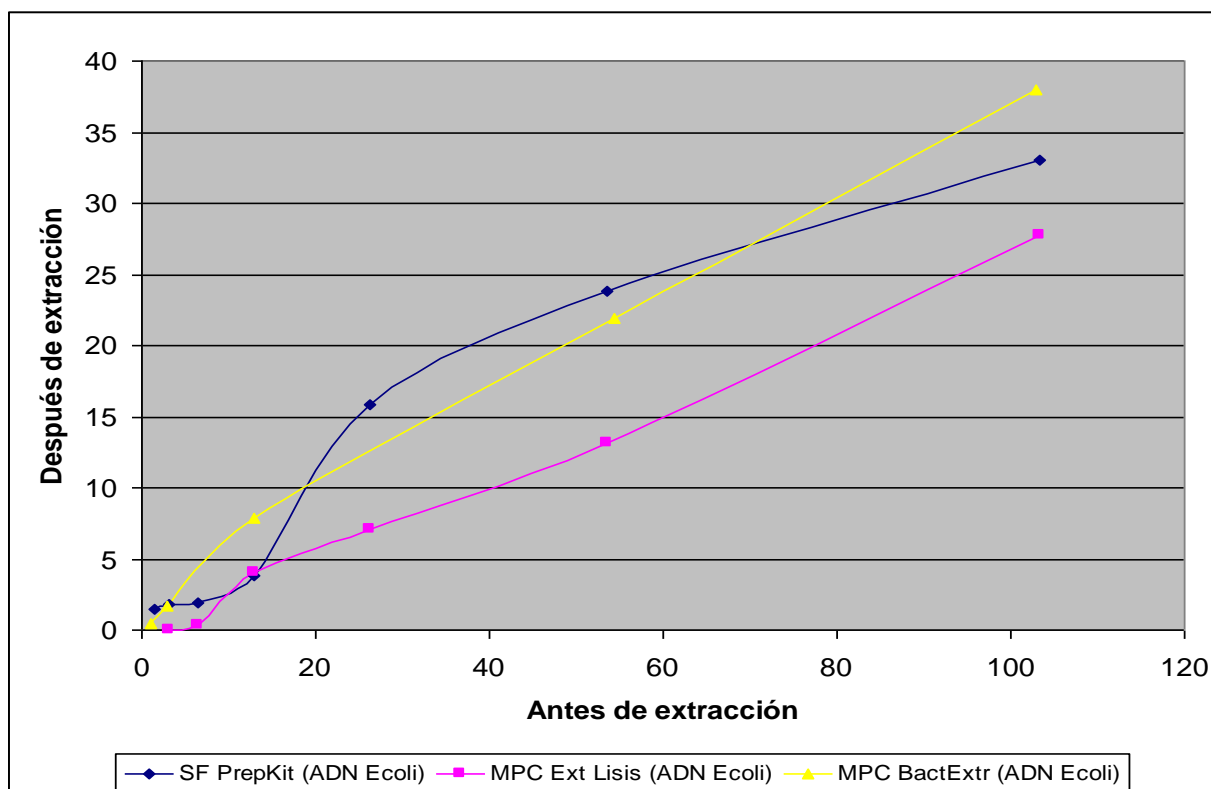
Fig.3



Con la extracción manual se obtiene mayor cantidad total de ADN que con el MPC. En la gráfica anterior se presentan los valores de las diluciones control con ADN estándar de *E. coli* y los correspondientes valores recuperados por ambos sistemas de extracción (siguiendo el protocolo para “lisis externa” en MPC) expresados como concentración en $\mu\text{g/ml}$. Los puntos representan los valores de la media, así como los máximos y mínimos recuperados con cada dilución. Los Boxplots muestran el rendimiento de los dos métodos, expresado también como concentración, no como cantidad total de ADN.

Si modificamos el protocolo de MPC para este mismo ADN estándar y seguimos el “*Bacterial DNA*” (aunque para el ADN en solución no sea necesaria la lisis bacteriana) el rendimiento en la recuperación de ADN (27%) se aproxima más al obtenido con la técnica manual como se puede ver en gráfica de la figura 4.

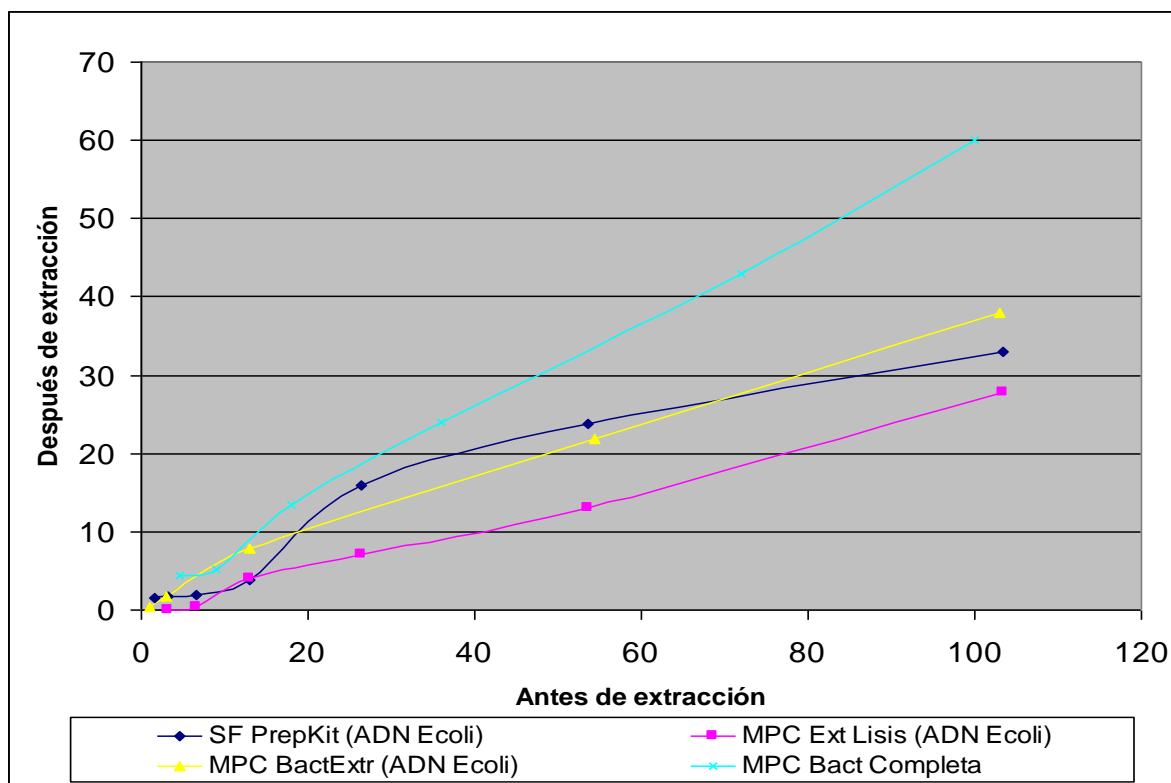
Fig. 4



Con toda probabilidad el carácter caotrópico del buffer de lisis facilita la adsorción del ADN en la superficie de las partículas magnéticas independientemente de su acción de lisis química sobre las estructuras celulares y bacterianas, aunque estos componentes disgregados y su presencia en el medio pudiera también contribuir a la facilitación de la adsorción del ADN, como parece deducirse de la gráfica de la Fig. 5.

El protocolo de “*Bacterial DNA*” es el más adecuado tanto para las muestras con bacterias completas como para las muestras clínicas. En estos dos tipos de muestras, la lisis preliminar por agitación mecánica en *MagNA Lyser* ha de ser completada mediante una lisis química que asegure la total liberación del ADN bacteriano y celular, exponiendo a la reacción de PCR también el ADN de bacterias intracelulares fagocitadas. Además la contribución del buffer de lisis resulta fundamental como adyuvante de la cromatografía de adsorción sobre las partículas magnéticas.²⁵⁵

Fig. 5



La gráfica de color azul muestra la concentración de ADN obtenida con MPC a partir del procesamiento de suspensiones de bacterias completas en Buffer TE pH 8.

Para garantizar la eficiencia de extracción del sistema MPC sobre los 25 patógenos detectados por el test y comparar sus resultados con los de la extracción manual, se inocularon artificialmente muestras de sangre total de voluntarios sanos con diferentes concentraciones de cepas de referencia de cada una de las 20 especies bacterianas y fúngicas que figuran en la siguiente tabla de resultados. Todas las muestras fueron analizadas por el sistema, sin necesidad de preincubación y todos los microorganismos y controles internos fueron identificados por su temperatura de *melting* (T_m) específica en los 4 canales de detección del LightCycler. El *software* de SeptiFast nos ha permitido determinar la presencia del ADN de todas las especies microbianas de su espectro a partir de la elución final obtenida por ambos métodos de extracción mediante la aplicación del rango de las T_m y los valores de *peak height* en que se basa dicho programa.

La realización de este ensayo con la mezcla de las 20 especies de la lista de *SeptiFast* no demostró discrepancias entre las dos técnicas al comparar las curvas obtenidas por el LightCycler. (Tabla 13)

Tabla 13. MPC : MagNa Pure Compact. SFM : *SeptiFast* Mgrade Extrac. Manual

	Microorganismo	ATCC	Tm MPC	Peak	Tm SFM	Peak	MPC	SFM
Gram negativos	<i>A. baumannii</i>	19686	65,38	0,42	64,00	0,08	+	+
	<i>E. cloacae</i>	13847	66,39	0,78	66,23	0,30	+	+
	<i>S. marcescens</i>	14756	58,00	0,36	58,00	0,24	+	+
	<i>S. maltophilia</i>	51331	63,09	0,16	63,08	0,38	+	+
	<i>E.coli</i>	25922	51,00	0,64	51,00	0,60	+	+
	<i>K.pneumoniae</i>	70063	59,22	0,12	59,01	0,19	+	+
	<i>P.mirabilis</i>	12453	55,01	0,25	54,63	0,32	+	+
	<i>P. aeruginosa</i>	27853	58,00	0,94	58,00	1,03	+	+
Gram positivos	<i>S.aureus</i>	25923	61,81	0,12	61,42	0,09	+	+
	<i>S.epidermidis</i>	12228	51,60	0,08	51,43	0,11	+	+
	<i>S.pneumoniae</i>	49619	56,80	0,23	56,69	0,46	+	+
	<i>S.agalactiae</i>	13813	51,13	0,07	51,80	0,01	+	+
	<i>E.faecalis</i>	29212	62,78	0,03	62,29	0,02	+	+
	<i>E.faecium</i>	35667	54,61	0,06	54,60	0,05	+	+
Hongos	<i>C.albicans</i>	90028	55,92	1,90	55,77	1,82	+	+
	<i>C.tropicalis</i>	750	59,00	0,09	59,00	0,06	+	+
	<i>C. parapsilosis</i>	22019	54,97	0,06	54,00	0,03	+	+
	<i>C. glabrata</i>	1526	59,70	0,40	59,99	0,34	+	+
	<i>C. Krusei</i>	6258	51,77	0,27	51,66	0,55	+	+
	<i>A. fumigatus</i>	36607	56,68	0,42	58,51	1,61	+	+

4.3 Estudio de Interferencia del ADN genómico en la extracción de ADN bacteriano con MagNA Pure Compact

4.3.1 Mezcla de ADN de placenta con ADN de *E. coli*

Partiendo de una concentración de 190 µg/ml de ADN de placenta humana en buffer TE, que cuando menos duplica la cantidad de ADN presente en una muestra de sangre total con leucocitosis moderada, se prepararon 4 diluciones 1:2 sucesivas, cada una de las cuales se mezcló con 0,02 µg de ADN de *E. coli* diluido en 4 µl de buffer TE (5 µg /ml) Una vez

sometidas todas las mezclas a extracción en MagNA Pure Compact (protocolo *Bacterial DNA*) se midió la concentración de ADN recuperado y se amplificó mediante *SeptiFast* la secuencia diana de *E. coli* para calcular la cuantificación absoluta. En la tabla 22 se pueden ver las medidas de la concentración de ADN y los puntos de corte (C.P.) de la amplificación.

Tabla 22

ADN Placenta humana	ADN Extrac MagNA Pure	Cuantificación absoluta (C.P.)
190 µg/ml	78,80 µg/ml	---
95 µg/ml	48,50 µg/ml	32,14
47,25 µg/ml	30,47 µg/ml	22,19
23,75 µg/ml	17,60 µg/ml	18,34
11,875 µg/ml	9,11 µg/ml	18,36

En la muestra de concentración más alta no se amplificó el ADN de *E. coli*. En las otras muestras la carga detectada de *E. coli* fue mayor (menor punto de corte) a medida que disminuía la concentración total de ADN, salvo en las dos últimas muestras, en las que se invierte esta tendencia.

4.3.2 Interferencia de sangre total (10.710 leucocitos/µl) con ADN de *E. coli*

Una muestra de sangre sin bacteriemia con 10.710 leucocitos/µl se sometió a lisis mecánica en MagNA Lyser, de manera análoga a la preparación de muestras clínicas para *SeptiFast* y posteriormente se realizaron 3 diluciones 1:2 consecutivas en buffer TE. Sobre el lisado de la muestra original y las diluciones se añadieron 0,02 µg de ADN de *E. coli* como en el experimento anterior. El ADN obtenido por la extracción con MagNA Pure Compact de todas las diluciones se midió y se amplificó con *SeptiFast* para determinar la cantidad recuperada de ADN de *E. coli* y/o la posible interferencia del ADN genómico sanguíneo en la PCR.

Tabla 23

Sangre (10.710 leucos/µl)	ADN Extrac MagNA Pure	Cuantificación absoluta (C.P.)
400 µl tras MagNA Lyser	40,8 µg/ml	16,89
Dil 1:2 con TEB	15,7 µg/ml	17,26
Dil 1:4 con TEB	8,07 µg/ml	17,24
Dil 1:8 conTEB	4,12 µg/ml	19

En contraste con la solución de ADN humano de placenta, en este caso no sólo no hubo inhibición de la PCR para *E. coli* en la muestra con mayor ADN genómico, sino que además se aprecia un aparente efecto paradójico que parece indicar una mayor recuperación de ADN de *E. coli* (C.P. más bajo en la PCR) cuanto menor es la dilución de la muestra de partida. Si observamos la medida de concentración en las diluciones obtenidas con el *MagNA Pure* podemos advertir un acusado descenso en la proporción del ADN recuperado de la primera dilución con respecto al obtenido de la muestra de sangre total sin diluir (la concentración del ADN extraído de esta primera dilución representa el 38,5% de la obtenida con sangre total) descenso de mayor magnitud que el encontrado con las otras diluciones, incluyendo las del ADN de placenta, en las que el rendimiento de la extracción nunca es inferior al 51,7% del ADN obtenido en las diluciones previas, salvo de la solución original, de la que se obtiene el 41,5% seguramente por la proximidad al límite de saturación de la técnica. Dicho de otro modo, la sangre total sin diluir parece ofrecer un medio óptimo para la extracción automática del MPC.

4.3.3 Evaluación clínica de los dos métodos extracción

Se procesaron alternativamente con las dos técnicas 106 muestras de sangre periférica pertenecientes a 72 pacientes de las UCI del Hospital Clínico Universitario de Santiago y del Hospital de CONXO, a los cuales se recogió simultáneamente una muestra para hemocultivo en sendos frascos *BactAlert* (bioMerieux) con medio para cultivo aeróbico y anaerobio. Los datos resultantes de estos tres procedimientos se pueden ver en la tabla 14.

Tabla 14

Case Num. (Ref.)	MagNapure/SeptiFast result	Manual/SeptiFast result	BloodCulture/Vitek II result	Observations: other bacteriological cultures
1.- (169)	CoNS	CoNS	CoNS	
2.- (185)	E. coli	Neg	Neg	
3.- (194d2)	<i>E. faecalis</i>	Neg	<i>E. faecalis</i>	Ascitic fluid (+) <i>Ent. faecalis</i>
4.- (195)	S. pneumoniae	Neg	Neg	Sputum (+) <i>S. pneumoniae</i>
5.- (204d2)	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Ascitic fluid (+) <i>E. faecium</i>
6.- (210)	<i>S. pneumoniae</i>	Neg	<i>S. pneumoniae</i>	
7.- (211d1)	<i>S. pneumoniae</i>	Neg	<i>S. pneumoniae</i>	
8.- (220)	CoNS	CoNS	CoNS	Catheter culture (+) CoNS
9.- (JAE)	Neg	Neg	B. fragilis	Ascitic fluid (+) <i>B. fragilis</i>
10.(235d3)	CoNS	Neg	CoNS	
11.(236d1)	<i>E.coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E.coli</i>	
12.(236d2)	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	
13.(242d2)	<i>K. pneumoniae/oxytoca</i>	<i>K.pneumoniae/oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
14.(242d3)	<i>K. pneumoniae/oxytoca</i>	<i>K.pneumoniae/oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
15.(244d1)	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	S. bovis	
16.(251d3)	CoNS	Neg	CoNS	
17.- (255)	<i>S. pneumoniae</i>	Neg	<i>S. pneumoniae</i>	Bronchial aspirate (+) <i>S. pneumoniae</i>
18.- (263)	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	Catheter, surgical wound (+) <i>C. albicans</i>
19.- (265)	Neg	K. pneumoniae	Neg	
20.(265d2)	CoNS	CoNS	CoNS	
21.(271d1)	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Synovial fluid, Bronchial aspirate (+) <i>S. aureus</i>
22.(271d2)	<i>St. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Bronchial aspirate (+) <i>S. aureus</i>
23.- (272)	<i>St. aureus</i>	Neg	<i>S. aureus</i>	
24.(280d1)	Neg	Neg	E. faecalis/MRSA	
25.- (311)	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	Catheter tip (+) <i>S. marcescens</i> .
26.- (313)	<i>S. marcescens</i> .	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	
27.- (327)	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis/P. aeruginosa</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Urine (+) <i>C. parapsilosis</i> /Bronchial aspirate (+) <i>P. aeruginosa</i>
28.- (329)	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	
29.- (343)	<i>E. cloacae/E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	Bronchial aspirate/wound exudate (+) <i>E. cloacae</i>
30.- (355)	<i>P. aeruginosa</i>	Neg	<i>P. aeruginosa</i>	Bronchial aspirate (+) <i>P. aeruginosa</i>
Additional 76 samples were Negative by all three methods				

La concordancia entre ambos métodos de extracción se analizó en primer lugar por comparación de los resultados obtenidos con la PCR *SeptiFast* entre ellos, usando como referencia de infección verdadera el de la extracción manual. Posteriormente se compararon los valores de *SeptiFast* de cada uno de los procedimientos de extracción con los resultados del hemocultivo, utilizando el valor de este como criterio de infección verdadera. (Tabla 15)

Tabla 15

A	LightCycler® Septifast MagNA Pure® compact extraction vs. LightCycler® Septifast manual extraction	LightCycler® Septifast manual extraction vs. Blood culture+VitekII identification	LightCycler® Septifast MagNA Pure® compact extraction vs. Blood culture+Vitek II identification.
Sensitivity	88.88 (65–98)	51.85 (31–71)	88.88 (70–97)
Specificity	87.5 (78–93)	98.73 (93–99)	96.2 (87–98)
Positive predictive value	59.25 (38–72)	93.33 (68–99)	88.88 (70–98)
Negative predictive value	97.46 (91–99)	85.71 (76–92)	96.2 (89–99)
Prevalence	16.98	25.47	25.47
Likelihood ratio Positive test	7,11 (3.99–12.65)	40.96 (5.64–297.03)	23.38 (7.64–71.53)
Likelihood ratio Negative test	0.126 (0.034–0.47)	0.487 (0.329–0.72)	0.115 (0.039–0.33)
B			
Proportion of agreement (strength of agreement)	0.87 (moderate)	0.86 (moderate)	0.94 (almost perfect)
Bias Index	0.08	–0.11	0
Prevalence Index	–0.57	–0.6	–0.49
Kappa (8)	0.637	0.592	0.85
C			
volume tested	400µl/1000µl	1000 µl/20ml.	400 µl/20 ml.

A: Comparación de las identificaciones obtenidas con *SeptiFast* usando ambos métodos de extracción y con hemocultivo más sistema Vitek II

B: Concordancia según test Kappa, que corrige la proporción de concordancia debida al azar.

C: Relación de los volúmenes de muestra utilizados en los diferentes experimentos.

Lo mismo que con los grupos de pacientes anteriores, al elaborar las tablas de contingencia para comparar los resultados de la PCR con los cultivos, hemos considerado los aislamientos de *SCN* como no representativos de enfermedad, puesto que el *SeptiFast* informa las contaminaciones como resultados negativos. Veamos esta evaluación en primer lugar mediante el seguimiento de los casos. En la Tabla 16 se ve la comparación de la PCR con la suma de hemocultivo y Microbiología convencional.

Tabla 16. SeptiFast / Hemocultivo + Micro. CONXO (seguimiento casos)

SeptiFast / Hemocultivo + Micro. CONXO (seguimiento casos)	Intervalos de confianza	Inferior	superior
Sensibilidad	47,22	38	55
Especificidad	87,5	82	91
Valor Predictivo Positivo	68	57	76
Valor Predictivo Negativo	74,66	69	79
Prevalencia	36		
Ratio Prob. Test Positivo	3,77	2,61	5,45
Ratio Prob. Test Negativo	0,603	0,513	0,7
<u>Kappa</u>	0,372		

Como quiera que el seguimiento de estos casos fue mucho más reducido que en los dos primeros grupos de pacientes, la sensibilidad de la técnica se ve disminuida, pero sin embargo se alcanza mayor especificidad que en el segundo de los grupos anteriores. En cambio la correlación entre los resultados de PCR y hemocultivo mejora sustancialmente, como podemos observar en la Tabla 17.

Tabla 17. SeptiFast / Hemocultivo. CONXO (seguimiento casos)

SeptiFast / Hemocultivo. CONXO (seguimiento casos)	Intervalos de confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	73,77	60	84
Especificidad	84,93	80	88
Valor Predictivo Positivo	47,36	37	57
Valor Predictivo Negativo	94,63	91	96
Prevalencia	15,52		
Ratio Prob. Test Positivo	4,89	3,64	6,58
Ratio Prob. Test Negativo	0,308	0,202	0,47
<u>Kappa</u>	0,478		

Con la pretensión de evaluar la capacidad de SeptiFast para detectar bacteriemia (aunque sea falsa bacteriemia) hemos querido revisar aquellos casos en los que se ha amplificado ADN de *SCN* en baja carga y que fueron informados como negativos por el SIS. De esta manera podemos contrastar su detección con los correspondientes hemocultivos en los que se obtuvo crecimiento de estos contaminantes. Si consideramos “positivos” los casos en los que se han encontrado estos microorganismos, veremos un considerable incremento en la sensibilidad de SeptiFast para revelar la presencia de bacteriemia.

Tabla 18. SeptiFast / Hemocultivo. CONXO (seguimiento casos) con SCN como (+) independiente de C.P. y de nº de tomas de aislamiento en hemocultivo.

SeptiFast / Hemocultivo. CONXO (seguimiento casos) con SCN como (+) independiente de C.P. y de nº de tomas de aislamiento en hemocultivo.	Intervalos de confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	78,49	68	86
Especificidad	80,33	75	84
Valor Predictivo Positivo	55,3	46	63
Valor Predictivo Negativo	92,33	88	95
Prevalencia	23,66		
Ratio Prob. Test Positivo	3,99	3,1	5,13
Ratio Prob. Test Negativo	0,267	0,18	0,39
<u>Kappa</u>	0,513		

La mayor sensibilidad de SeptiFast que se observa en este grupo de pacientes, utilizando *MagNA Pure Compact* para extraer el ADN, se evidencia mejor en la comparación con el hemocultivo determinación por determinación. En la Tabla 19 vemos estos datos considerando como negativos los aislamientos de SCN en la toma de hemocultivo cuyas muestras correspondientes para PCR presentan amplificaciones con C.P. > 20 (siguiendo el criterio de SeptiFast).

Tabla 19. SeptiFast / Hemocultivo CONXO (determinación) SCN C.P. >20 = Neg.

SeptiFast / Hemocultivo CONXO (determinación) SCN C.P. >20 = Neg.	Intervalos de confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	83,87	72	91
Especificidad	88,53	85	90
Valor Predictivo Positivo	43,33	34	52
Valor Predictivo Negativo	98,13	96	99
Prevalencia	9,46		
Ratio Prob. Test Positivo	7,31	5,7	9,38
Ratio Prob. Test Negativo	0,182	0,103	0,32
<u>Kappa</u>	0,51		

En la Tabla 20 podemos ver los resultados si consideramos como positivos los aislamientos de SCN y por lo tanto también damos valor positivo a cualquier amplificación de estas bacterias en la PCR.

Tabla 20. SeptiFast / Hemocultivo. CONXO (determinación) SCN = (+)

<u>SeptiFast / Hemocultivo. CONXO (determinación) SCN = (+)</u>	Intervalos de confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	67,82	58	76
Especificidad	79,44	75	82
Valor Predictivo Positivo	41,26	34	48
Valor Predictivo Negativo	92,06	89	94
Prevalencia	17,55		
Ratio Prob. Test Positivo	3,29	2,67	4,06
Ratio Prob. Test Negativo	0,404	0,309	0,52
<u>Kappa</u>	0,377		

En un intento de unificar los criterios de las dos tablas anteriores, hemos querido contar con las amplificaciones de baja carga de SCN que reflejan la presencia bacteriana en hemocultivo, pero dado que con una sola determinación de hemocultivo (la realizada en paralelo con la toma de SF) no es posible reconocer las falsas bacteriemias causadas por estos microorganismos, hemos decidido disminuir el posible sesgo excluyendo como positivos los aislamientos en los que la correspondiente PCR no detectó ADN de SCN así como las amplificaciones con C.P. > 20 en cuyo hemocultivo no se obtuvo crecimiento.

Tabla 21. SeptiFast / Hemocultivo CONXO (determinación) (+) si SF SCN (+) C.P.>20 con Hm (+) y Neg si SCN (+) en Hm ≠ SF

<u>SeptiFast / Hemocultivo CONXO (determinación) (+) si SF SCN(+) C.P.>20 con Hm(+) y Neg si SCN(+) en Hm ≠ SF</u>	Intervalos de confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	88,63	80	94
Especificidad	88	85	90
Valor Predictivo Positivo	53,42	44	61
Valor Predictivo Negativo	98,03	96	99
Prevalencia	13,43		
Ratio Prob. Test Positivo	7,39	5,84	9,35
Ratio Prob. Test Negativo	0,129	0,071	0,23
<u>Kappa</u> 0,599			

4.4 Beneficio terapéutico del diagnóstico molecular

Para comprobar el beneficio terapéutico que pudiera aportar el diagnóstico precoz de la PCR en tempo real a los pacientes con sepsis, hemos repasado los tratamientos

antimicrobianos que recibieron los pacientes de los dos primeros grupos de nuestro estudio. En esta revisión hemos encontrados 15 casos de tratamiento inadecuado, se podría haber evitado o modificado en un plazo más breve siguiendo el diagnóstico temprano proporcionado por *SeptiFast*.

El paciente nº 1 había ingresado por Urgencias con una sobreinfección respiratoria como complicación de su enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Durante su estancia en la UCI se colonizó por *Enterobacter cloacae* en el tracto respiratorio y padeció infección de orina por el mismo microorganismo. Al día siguiente se pudo amplificar su ADN en sangre, pero no se aisló de las muestras de hemocultivo hasta tres días después, y el informe correspondiente se emitió todavía dos días más tarde. El tratamiento empírico consistía en monoterapia con Levofloxacino, para una cepa que era resistente a quinolonas y se modificó por Cefepime cuando se comunicó la presencia de *Enterobacter cloacae* en el hemocultivo. Recibió tratamiento inadecuado durante 4 días desde que *SeptiFast* detectó la bacteriemia.

Paciente	DIC.2005									ENE.2006								
Días	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hospital																		
REA																		
SF/HC																		
					SF						SF							
AB								HC										
			Levofloxacinó															
											Cefepime							
										SF								
										Klebs.								
										SF	Klebs / Ent							
											SF	Klebs / Ent						
											Hc	Ent. cloacae (Q-R)						Exitus

En el paciente nº6 se amplificó *E. coli* mediante *SeptiFast* en la misma toma de sangre en la que posteriormente se aisló del hemocultivo una cepa de *E. coli* productora de ESBL, pero este crecimiento se obtuvo dos días más tarde, durante los cuales el tratamiento recibido era Linezolid (16 días antes se había retirado la cobertura con Meropenem que se reinició coincidiendo con la positividad del hemocultivo).

SF *E. coli*
E. coli **ESBL**
 Hc *E. coli* **ESBL**

Journal of Management Education 36(7) 809–826

SCN / Cand. alb.

(Vanco 4 días después)

SCN

Asp.bron

C. albicans

En el n° 17 la PCR adelantó 20 días sobre los cultivos (absceso, herida quirúrgica y posteriormente hemocultivo) el hallazgo de *Enterococcus faecalis* y permaneció 18 días sin cobertura antibiótica adecuada.

En el n° 17 la PCR adelantó 20 días sobre los cultivos (absceso, herida quirúrgica y posteriormente hemocultivo) el hallazgo de *Enterococcus faecalis* y permaneció 18 días sin cobertura antibiótica adecuada.

Paciente 17	ENE.2006														FEB.2006																						
	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	
Hospital																																					
REA																																					
Cirugía																																					
SeptiFast																																					
HC/Cex																																					
Imipenen																																					
Cefepime																																					
Levofloxacino																																					
Vancomicina																																					
Tobramicina																																					
Fluconazol																																					
Clindamicina																																					

SeptiFast (+)

Ent.faecalis

E.faecalis

E.faecalis

E.faecalis

E.faecalis

Ent.faecalis

Ent.faecalis

E. faecalis

E. faecalis

Cult/Hemcult.

E. faecalis

E. faecalis

Revascularización y marcapasos definitivo

Kleb (Pip/taz-S)?	Cand.
-------------------	-------

Hemocult.
(+)

1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633, 2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639, 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648, 2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654, 2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663, 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, 2669, 2670, 2671, 2672, 2673, 2674, 2675, 2676, 2677, 2678, 2679, 26

En el n° 21, un paciente que ingresó en Cirugía cardíaca para recambio de válvula mitral, se amplificó ADN de *Staphylococcus aureus* que no creció en los hemocultivos, probablemente debido a la cobertura antibiótica con Linezolid durante la mayor parte del ingreso. Mediante los procedimientos convencionales sólo se consiguió un aislamiento de *Staph. aureus* a partir del cultivo de la punta de un catéter dos días después del primer SeptiFast positivo. El Linezolid posee una acción fundamentalmente bactericida contra *Staph. aureus* y está indicado principalmente en infecciones causadas por *Enterococos* resistentes a Vancomicina y en infecciones complicadas de la piel y tejidos blandos causadas por *Estafilococos* Meticilín-resistentes, así como en neumonías debidas a estos mismos gérmenes o a *Streptococcus pneumoniae* resistente a Penicilina.

Pac.n°21						FEB.2006																						
26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Hosp																												
REA																												
SF																												
HC																												
C.Ex																												
Linezolid																												
Cefepime																												
Levoflox.																												

St. aureus St. aureus St. aureus
Staph M-S : Cloxa 10 días después

Pta. catet St. aureus

El paciente nº 36 desarrolló neumonía siguiendo a una intervención quirúrgica de doble by-pass coronario. Durante su ingreso presentó varios episodios diferentes de bacteriemia detectados tanto por PCR como por los cultivos convencionales y hemocultivo. De ellos cabe destacar la amplificación de *S.aureus* dos días antes de ser tratado con Vancomicina y de *Candida albicans* un día antes de recibir cobertura con antifúngicos.

Posteriormente se detectó, en este mismo paciente, ADN de *Ent. faecalis* 2 días antes de reiniciarse tratamiento con Linezolid.

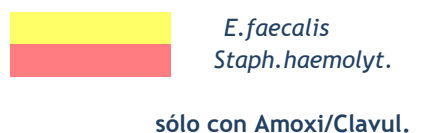
Doble bypass coronario

C.alb

E. faecalis (HLRA) / *Pseud.*

En el caso nº 45 se detecta *E. faecalis* en SeptiFast durante 3 días consecutivos, en los cuales se obtiene crecimiento de *Staph. haemolyticus* en hemocultivo (tal vez la proliferación de este posible contaminante enmascaró la presencia del *E. faecalis* en los cultivos) Desde un día anterior al primer positivo se mantenía un tratamiento con sólo Amoxicilina / Clavulánico, que pudo contribuir a la inhibición del crecimiento del *Enterococo* en cultivo. Finalmente, 9 días más tarde, se cambió a Linezolid.

Pac. n°45									Marzo 2006																		
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	30						
REA																											
Amoxi/Clavul.																											
													Linezolid														
																				Voric.							



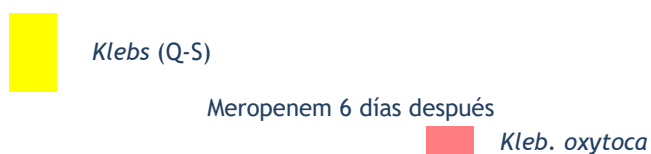
El paciente n° 48 presentó varios hemocultivos con *SCN*, en dos tomas de dos en uno de ellos, coincidiendo con un resultado positivo por *SeptiFast* para *SCN* con una cuantificación indicadora de bacteriemia verdadera. Al igual que en otros casos el informe de este hemocultivo acompañado de su antibiograma se retrasó 1 semana. La cepa era Meticilina-resistente y el paciente permaneció sin cobertura antibiótica adecuada durante este tiempo.

Pac. nº 48																Abril									
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6	7		
REA																									
		Cefepime																							



En el n° 50 se amplificó *Klebsiella. pneumoniae/oxytoca* en la misma muestra de sangre en la que se obtuvo crecimiento en hemocultivo de *Klebs. oxytoca*, pero el informe correspondiente se emitió 6 días más tarde, momento en el que se añadió Meropenem al tratamiento. Esta cepa era sensible *in Vitro* a quinolonas sin embargo pudo aislarse en sangre mientras se mantenía cobertura con Levofloxacino (< 5% de *Klebsiella. pneumoniae* y 5 - 10% de *Kleb. oxytoca* son resistentes a Levofloxacino) lo que demuestra que la positividad de la PCR durante el seguimiento de estos pacientes puede ser útil para aconsejar otras recomendaciones terapéuticas independientemente de los resultados de las pruebas de sensibilidad *in Vitro*.

Pac. 50																Abril								
Días		18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6	7	8	
Hospital																								
REA																								
Cirugía																								
Septifast																								
Linezolid																								
Levofloxacino																								
Meropenem																								



En el caso n° 54 se obtiene un cultivo de orina con > 105 UFC/ml de *Klebs. pneumoniae* en una muestra del día anterior a su detección por PCR. Aún así, debido al tiempo de incubación y pruebas para identificación y sensibilidad, el informe del urocultivo salió 5 días más tarde, durante los cuales el paciente no recibió un tratamiento adecuado. En este caso además cabe destacar la ausencia de hemocultivos capaces de detectar la bacteriemia.

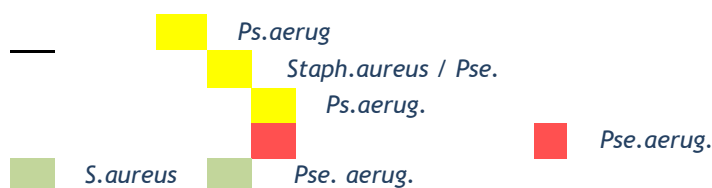
Paciente 54																		Abril.2006				
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5
Hospital																						
REA																						
Septifast																						
UroC																						
Voriconazol																						
Tobramicina																						



Caso n° 59:

Se trata de un paciente con colonización en la piel y tracto respiratorio por *Staph. aureus*, que posteriormente se coloniza también con *Ps. aeruginosa* en muestra de aspirado bronquial. SeptiFast detecta ADN en sangre de ambas bacterias, mientras que no se logra crecimiento del *S. aureus* en sangre, y la *Ps. aeruginosa* consigue aislarse en una muestra de hemocultivo de dos días más tarde, cuyo informe definitivo se retrasó 6 días más. La cepa de *S. aureus* era sensible a cloxacilina, y curiosamente la aparición de su ADN en sangre coincide con el cambio de cloxacilina por linezolid. La *Ps. aeruginosa* no fue tratada hasta 4 días después del primer SeptiFast positivo.

Paciente 59																Mayo.2006							
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8
Hospital																							
REA																							
Septifast																							
Cloxacilina																							
Linezolid																							
Cefepime																							



El paciente nº 60 ingresa por traumatismo toraco-abdominal y desarrolla empiema por *St. aureus*, que es tratado con drenaje quirúrgico y Linezolid. Una semana después se consigue amplificar ADN de *St. aureus* en SeptiFast mientras que los hemocultivos son negativos y en el líquido del drenaje se continúa aislando *St. aureus* Meticilín-sensible. 10 días más tarde se cambia el tratamiento a Cloxacilina.

En el nº 77 se aísla *St. aureus* en hemocultivo y en exudado de herida quirúrgica tras cirugía urgente por infección. A pesar del tratamiento de limpieza y drenaje de la herida más antibioterapia con Linezolid, una semana más tarde se amplifica en SeptiFast ADN del *St. aureus* (Meticilín-sensible) aún bajo la cobertura con Linezolid, sin que se hubiera obtenido su crecimiento en sangre.

Diagrama de flujo de la evolución de la flora bacteriana en un paciente con Clostridium difficile:

- Inicio: *S. aureus*
- Después de 14 días de Cloxa: *St. aur. (drenaje)* y *St. aureus (M-S) Ex. her. estern.*
- Final: *Can. alb.*

muestra de un paciente. No obstante, el procesamiento de las muestras no siempre puede efectuarse acumulando las 7 muestras que resultan en el óptimo aprovechamiento de cada set de reactivos. Cuando se hace un test con menor número de muestras, el gasto que exigen los múltiples controles de amplificación y de contaminación necesarios, condicionan un incremento en el coste de reactivos por paciente. Como los costes en este sentido representan una distribución no normal, hemos utilizado un agrupamiento de 1000 muestras para estimar la probabilidad de generar un incremento en el gasto provocado por la modificación de las condiciones en el uso de la técnica²⁵⁷ De esta manera hemos asumido un procesamiento medio de 3,5 muestras por ensayo, lo que implica un aumento de coste por muestra hasta alcanzar los 321 €.

En la tabla 10 se recogen los valores del coste de los componentes por paciente.

Tabla 10

<u>Componente</u>	<u>Unidad de medida</u>	<u>Coste por unidad</u>
Estancia Hospital	Día	273 €
Estancia UCI	Día	1.058 €
LC- SeptiFast	Paciente	183 €
LC- SeptiFast	Paciente	321 €
(*) (3,5 muestras/ensayo)		

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

La tasa de mortalidad después de 28 días fue 26% en el grupo control y 27% en el grupo intervencionista. Esta diferencia entre ambos grupos no es estadísticamente significativa, pero sin embargo existe un factor diferencial entre ambos grupos a este respecto que podría haber influido sobre las tasas de mortalidad encontradas, y es la distinta proporción en el genotipo que presentan los dos grupos para el promotor del receptor CD14, del que hablaremos más adelante.

En cambio sí que hemos encontrado una diferencia significativa en la duración de la estancia en UCI ($p < 0,05$) que fue de $31,0 \pm 19,4$ días en el grupo control y $22,9 \pm 29,9$ días en el segundo grupo. También resulta significativa, aunque menos marcadamente, la diferencia de la estancia media en el Hospital, que fue de $21,3 \pm 23,4$ días en el grupo control, frente a $18,3 \pm 21,4$ días en el segundo grupo.

El gasto en antibióticos, así mismo, revela otra diferencia importante entre ambos grupos, con un valor medio de 2.812 € en el grupo intervencionista y 3.576 € en el grupo control.

La suma de estas diferencias aporta un coste total por paciente considerablemente mayor para el grupo control (49.429 €) que para el grupo intervencionista (37.334 €) lo que supone 12.096 € más por paciente. (Tabla 11)

Tabla 11

	Grupo control	Grupo LCS intervencionista	P
Mortalidad 28 días	13 (26%)	14 (27%)	ns
Mortalidad 6 meses	20 (37%)	20 (41,6%)	ns
Estancia en UCI	31,0 ± 19,4	22,9 ± 29,9	P<0,05
Estancia en Hospital	21,3 ± 23,4	18,3 ± 21,4	P<0,05
Estancia en UCI	24,1 ± 21,9	18,3 ± 11,4	P<0,05
(sobrevivientes)			
Nº antibióticos/paciente	5,1 ± 3,1	4,2 ± 2,2	P<0,05
Coste trat Antib/paciente 3576 €	2812 €	P<0,05	
Coste estancia en UCI	32798 €	24246 €	P<0,05
Coste estancia Hospital	5824 €	4988 €	P<0,05
Coste Total	42198 €	32228 €	P<0,05

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

4.6 Polimorfismo C-159-T del promotor de CD14

El receptor de LPS juega un papel primordial en la génesis de la respuesta inflamatoria, y su diferente expresión tanto en la superficie de las células del sistema inmunitario como en su forma soluble en el plasma, puede estar relacionada con el pronóstico y la evolución de los pacientes críticos²⁴²⁻²⁴⁴ que por lo general poseen una historia clínica compleja cúmulo de diversos procesos patológicos concurrentes en un mismo individuo.

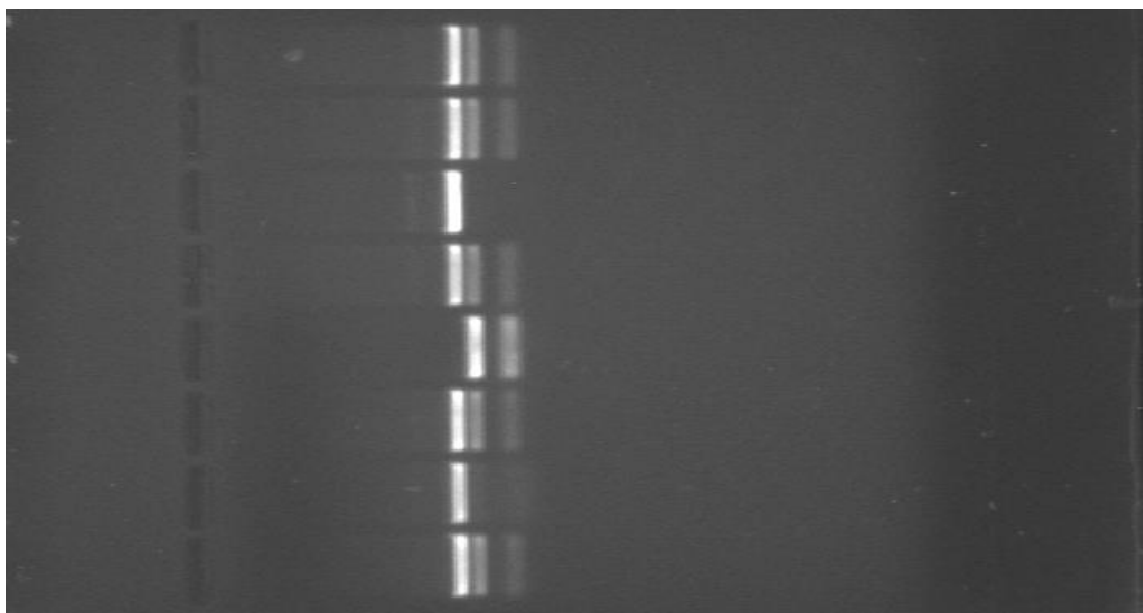
En los últimos años se ha debatido sobre la influencia de este polimorfismo en la evolución de múltiples patologías y se han efectuado estudios con resultados más o menos concluyentes sobre su posible implicación como factor capaz de modificar el pronóstico de

algunas de ellas. Como quiera que nuestros pacientes representan un grupo sometido necesariamente a un fuerte estímulo de la respuesta inmune y a su correspondiente modulación durante nuestro estudio, hemos querido investigar la presencia de los distintos genotipos del polimorfismo C-159-T en el promotor de este receptor y su posible relación con la presentación de la sepsis, su evolución y su mortalidad.

Para la determinación de este polimorfismo hemos empleado dos metodologías diferentes:

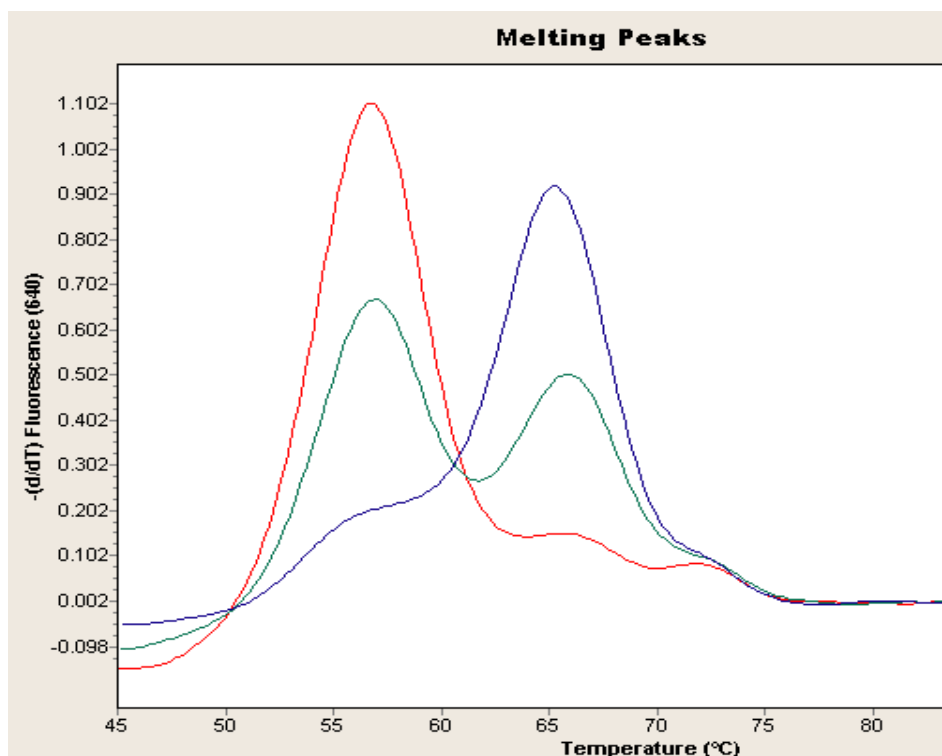
Análisis de restricción con Ava II para obtener un corte en la secuencia GGTCC que reconoce a los alelos CD14 / 159 - T (Fig. 1) y PCR a tiempo real marcada con sondas FRET de hibridación sobre la secuencia del polimorfismo, capaz de distinguir los tres genotipos posibles mediante los picos de *melting* resultantes de la región del promotor en que se hallan. (Fig. 2)

Fig. 1



Las calles 2 y 6 (desde abajo) corresponden a muestras de homocigotos CC, la calle 4 a un homocigoto TT y las restantes a heterocigotos CT.

Fig.2: El pico de *melting* para los homocigotos TT es de 56,5 °C (línea roja) y para los homocigotos CC es de 65,5 °C (línea azul) Los heterocigotos presentan doble curva de *melting* (línea verde)



Las proporciones totales encontradas de los distintos genotipos fueron 26,73% para la forma CC; 17,82% para TT y 55,45% para los heterocigotos CT, pero esta proporción no se mantuvo homogéneamente en ambos grupos de pacientes. En el grupo primero, control observacional, el porcentaje de los homocigotos CC fue considerablemente superior (36,5%) al del segundo grupo, intervencionista (16,66%) mientras que en este se encontró una mayor proporción de heterocigotos (66,66%) que en el primer grupo (46%) y el número de homocigotos TT fue similar en ambos grupos (18,86% y 16,66% respectivamente). (Tabla 12)

La mortalidad hallada en nuestro medio para las distintas poblaciones del polimorfismo muestra algunas diferencias que quizás deberíamos de considerar: Fallecieron el 29,6% de los homocigotos CC y el 32,1% de los heterocigotos, mientras que para los TT la mortalidad alcanzó el 44,44%. Resulta interesante la observación de que la proporción de casos de *SeptiFast* positivos presenta una tendencia casi inversa, es decir, mayor para los homocigotos CC (51,58%) que para los TT (33,33%) y los heterocigotos (30,36%) que se evidencia de modo similar si calculamos la proporción de los polimorfismos en los casos positivos: 36,8% CC; 44,7% CT y 18,4% TT.

Esta diferencia en la mortalidad de nuestros pacientes con los distintos polimorfismos C-159-T pudiera ser un factor a tener en cuenta a la hora de valorar la similitud en las cifras de mortalidad de nuestros grupos en estudio, ya que la distribución de dichos polimorfismos no resultó homogénea en ambos grupos. La mayor de las diferencias estriba en la proporción de homocigotos CC entre ambos grupos, algo más del doble en el primero (36,5 % del primer grupo frente a 16,66% en el segundo) mientras que la proporción de homocigotos TT es similar en ambos (18,86 % frente a 16,66 %). El genotipo CC es el que ha presentado mayor supervivencia en nuestro medio, por lo tanto se podría esperar que en nuestro segundo grupo se hubiera registrado una menor mortalidad si la proporción de estos homocigotos fuese superior.

Tabla 12

	CC	CT	TT
Total	26,73%	55,45%	17,82%
Mortalidad	29,6%	32,1%	44,44%
SeptiFast (+)	51,58%	30,36%	33,33%
	CC	CT	TT
Grupo 1^a	36,5%	46%	18,86%
Grupo 2^o	16,66%	66,66%	16,66%
SeptiFast (+)	CC	CT	TT
porcentaje	36,8%	44,7%	18,4%

4.7 Diagnóstico de infección polimicrobiana mediante la PCR LightCycler SeptiFast

En la revisión de un total de 500 pacientes de las tres series estudiadas en los servicios de UCI del Complejo Hospitalario a los que se aplicó SeptiFast, hemos encontrado 41 determinaciones por PCR de 40 pacientes, en las que se han podido detectar infecciones de más de un microorganismo en la misma muestra (en uno de los pacientes esto ocurrió en dos ocasiones, con identificación de gérmenes diferentes entre ellas) mientras que solamente hemos visto 12 hemocultivos de 11 pacientes en los que se recuperó el crecimiento de más de un microorganismo a la vez (igualmente hemos encontrado un caso en el que se aislaron dos microorganismos en distintos hemocultivos, a su vez con diferentes resultados entre sí). Obviamente hemos excluido de este recuento a los SCN considerados como contaminantes.

por ambas técnicas, y otras bacterias de crecimiento frecuente en hemocultivo sin significación clínica, como *Corynebacterium spp.* o *Bacillus spp.*

En 7 casos el SeptiFast pudo detectar 3 microorganismos en la misma muestra y en 3 ocasiones se amplificaron hasta 4 microorganismos (*E.faecium*, *E. faecalis*, *Kleb. pneumoniae* y *SCN* en una de ellas y *E.faecalis*, *E.coli*, *SCN* y *C. albicans* en las otras dos) En 9 de estas 10 infecciones múltiples se detectó ADN de *SCN*. La combinación más frecuentemente encontrada con doble detección en SeptiFast fue *Kleb. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* que ocurrió en 10 ocasiones, seguida por 3 casos con detección de *Kleb. pneumoniae* y *E.coli*, y dos casos con *Ent. cloacae* y *Aspergillus fumigatus*.

Los microorganismos más veces involucrados en estas infecciones múltiples fueron *Klebsiella pneumoniae*, que apareció en 15 ocasiones, seguida de *Enterobacter cloacae*, 13 veces presente, y de *E.coli* en 10 de los casos en lo que se refiere a los gram-negativos. Entre los gram-positivos, los que se encontraron con más frecuencia como copartícipes de la infección fueron *SCN* en 13 ocasiones y *E.faecalis* por 8 veces.

De los 12 hemocultivos con crecimiento polimicrobiano, sólo en uno de ellos se aislaron 3 bacterias (*E. faecalis*, *E. cloacae* y *Stenotrophomonas maltophilia*) en un paciente en el que SeptiFast detectó solamente ADN de *E. faecalis* y *E. cloacae* pero en muestras diferentes. En otras dos ocasiones de doble aislamiento por hemocultivo (*SCN* más *Kleb. pneumoniae* y *E. faecalis* más *SCN*) se confirmó la presencia de ambas bacterias en sangre mediante la PCR, y en un caso de aislamiento de *S. epidermidis* más *Fusobacterium necrophorum*, el SeptiFast solo pudo detectar el *SCN* dado que el anaerobio no se encuentra incluido en la lista de su espectro.

Tabla 24

SeptiFast		Coinfección			
4 x Microorganismos	2 x	SCN	E.faecalis	E. coli	C. albicans
	1 x	SCN	E.faecalis	E.faecium	K.pneumoniae
3 x Microorganismos	1 x	SCN	E.faecalis	E.faecium	
	1 x	SCN	E.faecalis	E.cloacae	
	1 x	SCN	E.cloacae	K.pneumoniae	
	1 x	SCN	E.cloacae	C.parapsilosis	
	1 x	SCN	E. coli	A.fumigatus	
	1 x	SCN	Ps.aeruginosa	S.maltophilia	
	1 x	Ps.aeruginosa	C. albicans	A.fumigatus	
2 x Microorganismos	10 x	K.pneumoniae	E.cloacae		
	3 x	K.pneumoniae	E. coli		
	2 x	E.cloacae	A.fumigatus		
2 x Microorganismos	1 x	SCN/ E.faecalis	E.coli/S.maltoph	S.aureus/S.malt	E.faecalis/P.aerug
		SCN/ E.faecium	E.coli/E.faecalis	C.albic/E.aerog	
		SCN/A.baumannii	E.coli/S.aureus	C.albic/A.fumigat	
		SCN/A.fumigatus	S.aureus/Ps.aerug	Str.pneum/E.faecium	
		E.coli/A.bauman.	S.aureus/S.marces	Str.pneum/Str.spp.	

4.8 Diagnóstico de Aspergilosis invasiva mediante PCR LightCycler SeptiFast

La aspergilosis invasiva (AI) es una complicación grave en pacientes críticos, con elevada mortalidad, que requiere un tratamiento precoz ante la sospecha de su diagnóstico. Sólo una veintena de las más de 150 especies del género *Aspergillus* causan patología humana, y entre ellas *Aspergillus fumigatus* (AF) es la que más frecuentemente se aísla en nuestro entorno, representando el agente causal de la mayoría de las infecciones invasivas.

El *Aspergillus* es un hongo filamentoso ubicuo que causa generalmente enfermedad asociada al aparato respiratorio, denominada aspergilosis pulmonar, como consecuencia de su vía de transmisión principal, por inhalación de esporas diseminadas en el aire. Pero para que esta infección pueda desarrollarse, es necesario que exista un importante compromiso de los mecanismos de defensa del huésped, pues el ser humano posee una notable capacidad para eliminar el *Aspergillus* por acción de macrófagos alveolares y neutrófilos.

El frecuente aislamiento de AF en pacientes sin AI y la escasa sensibilidad de su cultivo en sangre, incluso en la infección diseminada, dificultan el verdadero diagnóstico de esta enfermedad, que debe basarse, como el de cualquier enfermedad infecciosa grave, en la sospecha clínica inicial y en la posterior confirmación microbiológica. Por otra parte, al ser una enfermedad de sintomatología variable y poco específica, la sospecha clínica debe ser siempre confirmada por técnicas de imagen suficientemente sensibles como TAC o RMN.²⁵⁸

Las últimas definiciones de enfermedad fúngica invasiva publicadas por el *European Organization for Research and Treatment of Cancer / Invasive Fungal Infections Cooperative Group* (EORTC) contemplan tres niveles de probabilidad diagnóstica: AI probada, probable y posible.²⁵⁹

ASPERGILOSIS INVASIVA PROBADA

Requiere la demostración de la invasión fúngica en el tejido infectado:

- Examen microscópico o estudio histopatológico de muestra obtenida por biopsia o aspiración, donde se observen las hifas invadiendo el tejido.
- Cultivo de muestra estéril junto con síntomas clínicos o hallazgos radiológicos consistentes con proceso infeccioso. Se excluyen muestras de orina, senos paranasales o lavado broncoalveolar.

ASPERGILOSIS INVASIVA PROBABLE

Se precisa un factor de riesgo del huésped, junto con un criterio clínico o radiológico y otro microbiológico. Entre estos últimos se incluyen el aislamiento del hongo en cultivo de esputo, lavado o aspirado broncoalveolar, aspirado sinusal... Detección de antígeno de galactomanano en suero, lavado broncoalveolar o LCR. Detección de β -D-glucano en suero.

Debido al bajo rendimiento del hemocultivo para obtener el crecimiento de AF, la amplificación de su ADN mediante una PCR multiplex como *SeptiFast* que puede detectarlo en sangre, se convierte en una alternativa con un valor análogo al cultivo de una muestra estéril para contribuir al diagnóstico de AI probada. Aunque se han descrito diversas técnicas moleculares con este propósito, hasta la fecha no se han desarrollado métodos estandarizados

o disponibles comercialmente que puedan ser incluidos en la rutina de un laboratorio clínico. Por otro lado, el hecho de que *SeptiFast* consista en una PCR de amplio espectro contribuye a aumentar su valor diagnóstico para la AI, pues su cuadro clínico inespecífico no siempre orienta hacia esta patología como primera hipótesis diagnóstica y además hace posible la identificación del hongo cuando este pudiera coexistir con algún otro agente infeccioso en sangre.

En nuestro estudio prospectivo de los 400 pacientes del grupo de la UCI del Hospital de Conxo hemos encontrado 19 pacientes en los que se ha identificado AF mediante cultivo microbiológico convencional, de los cuales 9 tenían factores de riesgo y criterios clínicos, radiológicos o anatomopatológicos de AI, mientras que en los otros 10 solamente se obtuvo la identificación de AF en secreciones respiratorias, sin más criterios de AI. Entre estos dos grupos de pacientes no se encontraron diferencias significativas en su edad media (73 vs. 74) ventilación mecánica invasiva (9/9 vs. 9/10) APACHE II (27 vs. 29) y SOFA (9 vs. 7) a la admisión; pero sí en la mortalidad (100% vs. 30%) Los pacientes con AI fueron tratados con Voriconazol asociando ocasionalmente otros antifúngicos.

SeptiFast fue positivo para AF en 7 de los 9 pacientes con criterios de AI y en 3 de los otros 10. De acuerdo con la definición de consenso de AI, *SeptiFast* obtuvo una sensibilidad de 77,77% con 70% de especificidad para el diagnóstico de AI.

Tabla 25

	Intervalos de Confianza	Inferior	Superior
Sensibilidad	77,77	0,40	0,96
Especificidad	70	0,35	0,92
Valor Predictivo Positivo	70	34	93
Valor Predictivo Negativo	77,77	39	97
Prevalencia	47,36		
Ratio Prob. Test Positivo	2,59	0,94	7,11
Ratio Prob. Test Negativo	0,32	0,087	1,15
Kappa	0,475		

4.9 Diagnóstico de endocarditis infecciosa mediante PCR LightCycler SeptiFast en muestras de tejido valvular

La detección de ADN microbiano en tejido valvular mediante PCR ofrece mayor sensibilidad que los métodos convencionales de cultivo. Su fiabilidad se ha podido contrastar en el diagnóstico de la Endocarditis Infecciosa (EI) y en la identificación de nuevos agentes patógenos²⁶⁰⁻²⁶¹ hasta tal punto que se ha propuesto que la demostración de ADN microbiano en el tejido valvular debiera ser un criterio diagnóstico mayor de EI²⁶² y en la actualidad se recomienda el análisis molecular de dicho tejido o del material de émbolos producidos en la EI con hemocultivo negativo.²⁶³

Los resultados de los hemocultivos realizados antes de remitir a los pacientes para cirugía están reflejados en la tabla 23. Los 2 casos negativos habían recibido tratamiento antibiótico oral e intravenoso intermitente en su centro de referencia durante más de 4 semanas antes de extraer las muestras para hemocultivo. SeptiFast en sangre fue positivo en 9 casos y negativo en 6. El cultivo del tejido valvular fue positivo en 5 casos y negativo en 10. SeptiFast en el tejido valvular resultó positivo en todos los pacientes y coincidente con el hemocultivo y con SeptiFast en sangre lo que supone sensibilidad y especificidad de 100%.

Se observó una discrepancia entre el cultivo de la vegetación y SeptiFast del tejido valvular (caso 10) que se interpretó como posible contaminación de la muestra cultivada. (Tabla 26).

Tabla 26. Resultado de los cultivos y de los estudios moleculares en sangre y en tejido valvular.

Caso	Días*	Hemocultivo ^b	SeptiFast [®] sangre ^c	Cultivo válvula	SeptiFast [®] válvula
1	15	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	—	<i>Streptococcus</i> spp.
2	1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
3	82	—	<i>E. faecalis</i>	—	<i>E. faecalis</i>
4	35	—	<i>E. coli</i>	—	<i>E. coli</i>
5	9	CoNS	CoNS	—	CoNS
6	18	<i>S. intermedius</i>	—	—	<i>Streptococcus</i> spp.
7	11	<i>S. agalactiae</i>	—	—	<i>Streptococcus</i> spp.
8	39	<i>E. faecalis</i>	—	—	<i>E. faecalis</i>
9	13	<i>S. aureus</i>	—	—	<i>S. aureus</i>
10	10	<i>S. epidermidis</i>	CoNS	<i>S. mitis</i> ^d	CoNS
11	7	<i>S. epidermidis</i>	CoNS	<i>S. epidermidis</i>	CoNS
12	4	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
13	3	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
14	54	<i>S. oralis</i>	—	—	<i>Streptococcus</i> spp.
15	25	<i>S. aureus</i>	—	—	<i>S. aureus</i>

*Número total de días de tratamiento antibiótico continuo o intermitente antes de la intervención quirúrgica.

^bEl hemocultivo se extrajo antes de remitir a los pacientes para tratamiento quirúrgico.

^cLa muestra para SeptiFast[®] se extrajo entre 1 y 24 días después del hemocultivo.

^dSe consideró contaminación de la muestra.

—: negativo; CoNS: estafilococos coagulasa negativos; E: *enterococcus*; S: *streptococcus*.



6.-DISCUSIÓN



La utilización de los recursos que proporciona la biología molecular para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas ha propiciado una auténtica revolución metodológica durante las últimas décadas en los laboratorios de Microbiología Clínica. Los nuevos procedimientos se imponen paulatinamente sobre los métodos tradicionales, a los que primero sirven de complemento y finalmente reemplazan, dado el mayor rendimiento que las nuevas técnicas ofrecen en cuanto a sensibilidad y rapidez en la obtención de resultados. Por otro lado, la precisión de las mediciones moleculares permite una mayor objetividad a la hora de interpretar la información, disminuyendo los errores en el examen por inexperiencia, fatiga o perjuicios del observador.

Para aprovechar este potencial en el diagnóstico de la sepsis, se han desarrollado diversos métodos moleculares diagnósticos con resultados dispares aunque prometedores. Sin embargo, por el momento, estos sistemas presentan algunos inconvenientes que podrían ser minimizados con el uso de *SeptiFast*, como exponemos en esta discusión.

Algunos de los estudios publicados²⁶⁴ que obtienen mejores resultados en la correcta identificación y correlación con el hemocultivo se basan en la realización de una PCR anidada (nested-PCR) seguida de secuenciación, en lugar de una PCR a tiempo real. Sin embargo tan prolongada metodología elimina uno de los objetivos de las técnicas moleculares, como es la posibilidad de acortar los tiempos de diagnóstico. Otro inconveniente a su aplicación, sería la dificultad de incluir en la rutina y con la continuidad que requiere el diagnóstico clínico de urgencia, una técnica compleja, que exige el seguimiento por parte de personal especializado de diversos pasos, que habrían de adaptarse a las limitaciones de los diferentes turnos laborales.

También se han ensayado sistemas de PCR a tiempo real antes de la aparición de *SeptiFast*., con buenos resultados en cuanto a la sensibilidad obtenida²⁶⁵ pero en general cuentan con una alta proporción de positivos en muestras con hemocultivo negativo, atribuibles a contaminaciones durante el proceso.²⁶⁶

Entre las peculiaridades de *SeptiFast*, a diferencia de otros métodos descritos de PCR²⁶⁷⁻²⁶⁸ se incluye la utilización de controles internos para monitorizar todo el proceso de amplificación, desde la extracción de ADN hasta la reacción y el revelado de la PCR a tiempo

real, mediante sondas específicas cuyos “*melting points*” se analizan semi-automáticamente por el *software* del sistema.

Para evitar señales inespecíficas debidas a microorganismos ambientales contaminantes y aumentar la sensibilidad del análisis, se utilizan reactivos de PCR de alta calidad, siguiendo las sugerencias discutidas recientemente en la literatura científica.²⁶⁹⁻²⁷¹ A estas medidas encaminadas a disminuir interferencias analíticas, se ha de añadir la aplicación automática de los puntos de corte determinados por el *software* para *SCN* y *Streptococcus spp.* que permiten excluir los informes positivos de aquellos casos en los que la presencia de dichas bacterias no tiene relevancia clínica.

Sólo el 10–30% de los *SCN* aislados en un hemocultivo son verdaderos patógenos, la diferenciación entre patógenos verdaderos y contaminantes reduce el consumo de antibióticos innecesarios y la aparición de resistencias. Lee y col. demostraron, en un estudio realizado en el 2007, que cerca del 40% de pacientes con pseudobacteriemia o bacteriemia falsa habían sido tratados innecesariamente con antibióticos sistémicos, sin este tratamiento supusiese un beneficio terapéutico para el paciente y sí un aumento importante en el coste de su estancia hospitalaria y un mayor riesgo en la posibilidad de desarrollo de resistencias. Este trabajo muestra la necesidad de desarrollar métodos que permitan la diferenciación clara entre pseudobacteriemia y bacteriemia verdadera, entre los que se encuentra el SeptiFast.²⁷²

Lehman y col., en un estudio realizado en el 2008, analizaron 574 muestras de sangre de voluntarios sanos y 102 pacientes de UCI para establecer el punto de corte, en forma de CP, que permitiese discriminar entre cantidades bajas de bacterias responsables del proceso infeccioso y bajas concentraciones de ADN resultantes de contaminación por la flora de la piel durante el proceso de la extracción de la muestra. No obstante, es necesario realizar estudios posteriores con otros grupos de pacientes para conocer si este punto de corte es válido en todos los casos o debe modificarse en función de la patología de base del paciente.²⁴¹

Las regiones diana seleccionadas por SeptiFast, las ITS bacterianas 16S–23S y fúngicas 18S–5,8S, están presentes en múltiples operones en los genomas de bacterias y hongos²⁷³ lo que proporciona un aumento en la sensibilidad del método. Además, estas regiones, facilitan una mayor precisión en la identificación de los microorganismos, ya que

son más específicas de especie que la región conservada del rDNA.²⁷⁴ Las mediciones de los picos de *melting* determinadas para los microorganismos representativos de la lista del espectro de SeptiFast en los cuatro canales del LC 2.0 varió solamente entre 0,19 y 0,54 °C en el estudio de Lehmann et al.²⁷⁵ de manera que se evita la ambigüedad en las identificaciones, mejorando la interpretación con respecto a otros métodos basados en PCR publicados.

El límite de detección que se ha calculado para SeptiFast en experimentos con sangre anticoagulada con EDTA a la que se añadieron distintas concentraciones de bacterias y hongos oscila entre 3 y 30 UFC/ml según los diferentes microorganismos (*Kleb. pneumoniae*, *C. glabrata*, *Streptococcus spp.* y *SCN* se detectan en un rango de 0% a 80% si se encuentran a la concentración de 3 UFC/ml²⁷⁵ Frente a estos valores, los estudios de hemocultivos cuantitativos revelan que la mayoría de episodios de bacteriemia clínicamente significativa en adultos se caracterizan por un número bajo de bacterias circulantes, número que sin embargo es mucho mayor en niños, en los que generalmente esta cuantificación presenta una relación inversamente proporcional a su edad. Werner et al.²⁷⁶ informan que un 54% de los hemocultivos de adultos con endocarditis por *Staphylococcus spp.* O *Streptococcus spp.* contienen entre 1 y 30 UFC/ml; y Kreger et al.²⁷⁷ documenta un 73% de pacientes con bacteriemia por bacilos Gram-negativos con hemocultivos que poseen < 10 UFC/ml.

Según estos estudios, la sensibilidad de 3–30 UFC/ml limitaría la capacidad de SeptiFast para el diagnóstico de pacientes con bacteriemias paucibacilares comparada con una sensibilidad teórica de 1 UFC/ml en una botella de hemocultivo convencional inoculada con 10 ml de sangre. Por lo tanto SeptiFast no puede sustituir al hemocultivo por su menor sensibilidad, especialmente antes de iniciar la terapia antimicrobiana. Además hoy por hoy, es necesario obtener el aislamiento del microorganismo infeccioso para realizar las pruebas de sensibilidad a los agentes antimicrobianos, que SeptiFast no puede efectuar. No obstante, en ocasiones en las que la viabilidad bacteriana estuviese comprometida, SeptiFast si que podría contribuir a un diagnóstico que el hemocultivo es incapaz de proporcionar. Tal es el caso de pacientes sometidos a tratamiento antibiótico en los que la PCR puede detectar bacterias no viables. Von-Lilienfeld-Toal et al.²⁷⁸ encuentran que la PCR positiva en pacientes sin tratamiento, con frecuencia persiste positiva durante uno o dos días más y durante el tratamiento se detectan “restos” bacterianos en la PCR cuando el hemocultivo es negativo (lo que concuerda con nuestras observaciones) sugiriendo que la cuantificación de la carga de

ADN microbiano podría ser de interés en el contexto del curso clínico de la enfermedad. Igualmente apuntan que, independientemente del tipo de infección de que se trate, la detección de motivos CpG bacterianos podría ser clínicamente relevante por sí misma, dado que poseen un importante efecto proinflamatorio²⁷⁹ En este sentido, han observado que pacientes con PCR positiva, presentan elevados niveles séricos de procalcitonina.

Por otro lado, la PCR podría ampliar las posibilidades de diagnóstico del hemocultivo, detectando la presencia de ADN intracelular²⁷⁸ de bacterias fagocitadas por los neutrófilos sanguíneos y en el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas. En el mismo estudio 189, realizado en pacientes neutropénicos, se elude a la baja población de neutrófilos como posible causa de la baja concentración de ADN microbiano en estos pacientes, y concluyen que si bien el hemocultivo resulta indispensable para no perder sensibilidad, en situaciones como la fiebre persistente durante tratamiento antibiótico o en infecciones fúngicas invasivas, el rendimiento de la PCR se impone al del hemocultivo.

La necesidad de iniciar una terapia empírica de amplio espectro inmediatamente tras la sospecha clínica de sepsis, con frecuencia dificulta la posibilidad de aislar microorganismos viables en sangre y obliga al clínico a tomar decisiones críticas sin confirmación microbiológica. Aunque la detección de ADN microbiano en sangre difiere de los métodos clásicos basados en la viabilidad y pudiera tener significados añadidos, ambas metodologías son válidas para definir la infección y útiles en la práctica para monitorizar pacientes sépticos. La diferencia en los tiempos de diagnóstico, representa la primera de las ventajas de *SeptiFast*, no tan obvia con otros métodos moleculares como ya hemos comentado, y resulta especialmente crítica para los pacientes sépticos.

6.1 Modificación de la técnica de extracción de ADN

El diagnóstico molecular involucra 3 pasos consecutivos: extracción de ácidos nucleicos, amplificación (PCR) y detección y análisis de las dianas moleculares. El procedimiento recomendado por el fabricante para *SeptiFast* propone una técnica de extracción manual que proporciona la suficiente sensibilidad, empleando materiales y reactivos que garantizan la ausencia de contaminación externa, pero consume la mitad del tiempo total necesario para la obtención de los resultados, y además exige la realización de

múltiples pasos en los que han de manipularse muestras y reactivos con las precauciones propias de estas técnicas moleculares.

Con el objeto de disminuir los inconvenientes de este prolongado proceso, que limita la facultad de informar al clínico antes de que se instaure un tratamiento empírico, hemos modificado la técnica de extracción sustituyéndola por un método automático de los múltiples que en los últimos años se han desarrollado para usar en conjunción con las técnicas de PCR. Estas tecnologías reducen el tiempo y los errores humanos en el trabajo, aumentando la precisión y reproducibilidad de resultados para un amplio número de muestras.²⁸⁰ El método automático además, permite evitar posibles interferencias entre diferentes laboratorios debidas a la manipulación, por lo que podría contribuir a una mejor estandarización de la técnica.

Hasta el momento, se han elaborado algunos trabajos sobre la automatización de este proceso de extracción²⁸¹⁻²⁸² seleccionando para ello distintos sistemas. En nuestro caso, hemos decidido escoger *MagNA Pure Compact* (MPC) para nuestro propósito, en primer lugar porque es uno de los métodos comerciales con nanopartículas magnéticas más rápido²⁸³ que utiliza sólo 34 min., con una diferencia de 15 min. dependiendo del número de muestras procesadas; y en segundo lugar porque su capacidad máxima por ensayo de 8 muestras se correlaciona perfectamente con la de *SeptiFast*. Esta alternativa supone una importante reducción en el tiempo total de la prueba, de las $6,54 \pm 0,27$ h siguiendo la extracción manual, a 3,58 h con la automática (42 min. corresponden al paso previo de lisis mecánica más la extracción automática, que se siguen de 139 min. para la detección por PCR).

Nuestra evaluación se ha centrado fundamentalmente en tres aspectos: En primer lugar, comprobar el rendimiento de la extracción por ambos métodos; en segundo lugar, la funcionalidad del método para conseguir identificar todas las dianas de la *master list* de *SeptiFast*, y finalmente, en definir el protocolo más adecuado, que mejor se ajuste al diagnóstico con *SeptiFast*.

Utilizando ADN de *E. coli* como estándar disuelto en TE buffer PH8 hemos encontrado un rendimiento similar entre ambos métodos (24,14% y 27% MPC según los protocolos utilizados vs. 28,54% para la técnica manual) La cantidad total de ADN obtenida con la técnica manual es mayor que la conseguida con MPC, sin embargo se recupera diluida en un mayor volumen final (300 µl vs 200µl) y dado que la presencia de ADN de leucocitos

en las muestras de sangre de los pacientes con frecuencia se acerca al valor de saturación, pensamos que esta diferencia no sería significativa para su aplicación clínica, tal como hemos podido comprobar posteriormente.

Para determinar la funcionalidad de la extracción automática, hemos validado la correcta identificación de las diferentes especies incluidas en la *master list* de *SeptiFast* comparando los picos de *melting* y los *peaks heights* obtenidos tras la amplificación del ADN recuperado con ambos métodos de extracción. La prueba demostró que *MPC* es una alternativa válida, que reduce considerablemente el tiempo de trabajo y el tiempo total de detección e identificación con el sistema molecular.

La extracción de ADN estándar de *E. coli* se llevó a cabo, en un primer momento, siguiendo un protocolo de *MPC* para lisis externa, puesto que se trataba de ADN en solución, pero como la aplicación clínica principal de *SeptiFast* se ha previsto para sangre periférica, hemos probado la extracción de este ADN estándar siguiendo el protocolo de *MPC* designado como *Bacterial DNA* para muestras de sangre, con buffer de lisis, a partir de 400 µl. Nuestras observaciones indican que este último consigue un aumento en el rendimiento de la recuperación de ADN por el efecto caotrópico del buffer. Así mismo hemos querido probar la influencia que pudiera tener la agitación mecánica en *MagNA Lyser* a la que se someten las muestras clínicas, sobre el ADN de *E. coli* en solución, pero en este caso no hemos encontrado diferencia en la cantidad final de ADN recuperado a partir de las muestras del ADN fragmentado o no fragmentado mecánicamente.

Finalmente era preciso conocer la cantidad necesaria de C.I. que debíamos de añadir a cada muestra. Hemos probado 3, 4 y 5 µl. sobre los 400µl. de muestra total (4 µl representan la misma proporción 1:100 que los 10µl. que se incluyen sobre 1ml de sangre en la técnica manual) Los tres volúmenes permiten detectar el C.I. al final de la PCR sin competir con las otras dianas de amplificación, así que hemos optado por usar 4µl en orden de mantener la proporción de la técnica original.

En definitiva, nuestra propuesta para la extracción automática de ácidos nucleicos que permite reducir la manipulación (y por tanto los posibles errores y contaminaciones derivados de ella) y el tiempo total de *SeptiFast* sin pérdida de sensibilidad en el test, consiste en el protocolo *Bacterial DNA* con 400 µl. de volumen de sangre periférica previamente agitada en

Magna Lyser, sobre el que añadimos 4µl. de C.I. inmediatamente antes de iniciar el proceso en *MPC*. El volumen de elución final obtenido es de 200µl. suficiente para las tres reacciones de PCR de *SeptiFast*, puesto que cada una de ellas precisa 50 µl. de muestra, y permite reservar los 50 µl sobrantes para efectuar el test que detecta la presencia de *mecA* en caso de que se haya obtenido amplificación de ADN de *Staphylococcus spp.*

En el estudio clínico prospectivo con 72 pacientes, se procesaron 106 muestras en paralelo mediante las dos técnicas de extracción junto con el correspondiente hemocultivo para cada caso (en frasco aerobio y anaerobio) Puesto que una definición objetiva de enfermedad en pacientes con bacteriemia resulta difícil ⁴ para evaluar la técnica modificada con *MPC* escogimos como criterio de infección en el compartimiento sanguíneo el resultado de la PCR con extracción manual o el del hemocultivo. Según el primer criterio, la sensibilidad de *SeptiFast* con *MPC* fue sólo de 51,85%. Esta discrepancia entre los dos procedimientos de extracción podría ser debida al diferente volumen de sangre utilizado, que pudiera condicionar distinta eficacia en los procesos enzimáticos durante el paso de lisis. A mayores, la presencia de ADN genómico u otros elementos en distintas proporciones podrían afectar a la adsorción inespecífica del ADN microbiano detectado por *SeptiFast* ²⁸⁴ Cuando comparamos *SeptiFast* mediante extracción convencional con el resultado del hemocultivo simultáneo, obtenemos una sensibilidad similar (56%). Otras causas como el efecto de tratamiento antibiótico previo o el aislamiento de microorganismos viables no incluidos en el espectro de *SeptiFast* también podrían contribuir a explicar estas discrepancias. Pero sorprendentemente, al comparar el hemocultivo positivo simultáneo con *SeptiFast* tras la extracción automática, encontramos una sensibilidad de 92% con un coeficiente Kappa que indica una concordancia casi perfecta en la identificación (Vitek II) de los microorganismos aislados en hemocultivo y la obtenida con *SeptiFast* tras *MPC*. ²⁸⁵

¿Cómo explicar estos resultados más favorables a *MPC* para detectar bacteriemia en muestras clínicas? Tal vez alguna característica del ADN bacteriano, como su alta proporción de motivos CpG, pueda facilitar una adsorción selectiva de este ADN en la superficie de las nanopartículas magnéticas. El *MPC* realiza distintos pasos de mezcla entre las partículas en suspensión y la muestra con el buffer, manteniendo todos estos componentes en agitación mediante múltiples pipeteos. Se crea pues, una exposición dinámica que promueve la interacción nanopartícula-ADN sacando el máximo aprovechamiento de la superficie de

adsorción de las partículas en suspensión. Esta interacción dinámica pudiera tener mayor relevancia para secuencias más pequeñas dispersas en la muestra, especialmente si estas presentasen más afinidad, ya que aumenta la probabilidad de contacto en las condiciones adecuadas con la superficie de adsorción, y minimiza la interferencia que pudiera derivarse del exceso de ADN genómico leucocitario. En cambio la interacción del ADN con la superficie de adsorción en las columnas de la técnica manual, se fundamenta en un proceso estático de filtración que no garantiza de igual manera la exposición del ADN bacteriano disperso a la superficie de cromatografía de adsorción.

Los métodos automáticos no son los más adecuados para mantener la integridad del ADN de gran tamaño, pero si resultan muy útiles cuando lo que se busca es recuperar secuencias pequeñas, reduciendo el tiempo del proceso y la manipulación.

También es posible que la presencia en el medio de los componentes de la pared bacteriana derivados de los pasos de lisis facilite el efecto caotrópico de los búferes, incrementando el secuestro de moléculas de agua y promoviendo así una mayor interacción por fuerzas de Van der Waals de carácter atractivo entre la superficie de las nanopartículas y el ADN (En nuestros experimentos hemos podido comprobar que *MPC* recupera mayor proporción de ADN de *E. coli* a partir de la lisis de bacterias completas que a partir de ADN de *E. coli* estándar purificado en solución). También hemos observado que la sangre total o algunos de sus componentes, salvando la posible interferencia del exceso de ADN leucocitario, parecen facilitar la recuperación o la amplificación del ADN estándar de *E.col.*.²⁸⁶

En nuestro estudio las seis discrepancias encontradas entre *SeptiFast* con extracción automática y el hemocultivo incluyen el crecimiento de una bacteria que no se encuentra en el espectro de *SeptiFast* (*Bacteroides fragilis*), otro caso con crecimiento de *Streptococcus bovis* en una muestra con identificación de *S.aureus* en *SeptiFast*, diferencia que podría explicarse por los distintos criterios de identificación; fenotípicos en Vitek II frente a genotípicos en *SeptiFast*. Otras dos bacterias aisladas en cultivo pero negativas por PCR (*S. aureus* y *E. faecalis*) y otras dos detectadas por *SeptiFast* con extracción automática cuyos hemocultivos fueron negativos (*E. coli* y *S. pneumoniae*) pertenecen a muestras de pacientes que habían recibido terapia antibiótica previa a su inclusión en el estudio.

6.2 Beneficio terapéutico con el diagnóstico molecular

. Aunque algunos de los tratamientos utilizados en la sepsis severa y el shock séptico como los corticoides, drotrecogín α o el control de glucosa... son objeto de debate; otras medidas, como la estabilización hemodinámica o el uso de antibióticos, se consideran indispensables ²⁸⁷ y, de acuerdo con las recomendaciones de las guías de procedimientos, deben de administrarse en las primeras fases del proceso infeccioso. Como casi siempre es necesario recurrir a tratamientos empíricos, conviene anticipar las oportunas tomas de muestra para cultivo microbiológico, previas al inicio de la terapia, con objeto de establecer el correspondiente diagnóstico etiológico.

Los resultados de nuestro estudio comparativo entre los dos primeros grupos de pacientes (observacional e intervencionista) reflejan una mortalidad similar para ambos a los 28 días y a los 6 meses. Varios autores han destacado la relevancia del uso precoz del tratamiento antibiótico adecuado en pacientes sépticos ²⁸⁸⁻²⁹⁰, y el incremento de mortalidad en los pacientes que no son tratados adecuadamente. La identificación del microorganismo causante en pocas horas debería de servir para garantizar la eficacia del tratamiento antimicrobiano, y por tanto aumentar la supervivencia. Sin embargo no hemos encontrado esta reducción esperada en la mortalidad, que podría explicarse por la influencia de diversos factores. En primer lugar por el tamaño de nuestras muestras. En segundo lugar porque cuando se sospecha una sepsis severa o un shock séptico en la UCI, se inicia un tratamiento empírico de amplio espectro que posibilita la cobertura del germen causante aún cuando sea desconocido, pero en muchos casos es necesario recurrir al uso de “demasiados” antibióticos. Finalmente, porque la alta mortalidad de muchos de estos pacientes viene determinada no sólo por su proceso infeccioso, sino por su enfermedad de base por sí misma. Es frecuente que estos enfermos hayan sido sometidos a intervenciones quirúrgicas de alto riesgo, como cirugía cardiovascular o abdominal y a otras múltiples intervenciones que comportan intrínsecamente un alto riesgo de mortalidad que no puede modificarse solamente con el tratamiento antibiótico adecuado. Si bien nuestros dos grupos de estudio eran aparentemente homogéneos, es posible que la existencia de múltiples factores (muchos aún desconocidos y otros cuya influencia es difícil de definir) condicionasen alguna diferencia entre ellos, por ejemplo a nivel de la modulación de la respuesta inmune, que también podría contribuir a modificar la mortalidad de alguno de los grupos. En este sentido, la diferencia que hemos observado a

posteriori, que ambos grupos presentan en el polimorfismo C-159-T del promotor del receptor del LPS, CD14, podría haber jugado un papel importante para nuestros resultados. No obstante la revisión del tratamiento empírico que recibieron los pacientes de los primeros grupos durante su evolución, nos ha permitido encontrar 15 casos de tratamiento no adecuado que podría haber sido modificado en un plazo más breve siguiendo el diagnóstico de *SeptiFast* dirigido sólo por los resultados de la microbiología convencional.

Las discrepancias ocasionales entre PCR multiplex a tiempo real y los resultados de hemocultivo simultáneo se han documentado anteriormente,²⁸⁸⁻²⁹⁰ ocurren fundamentalmente en 5 ocasiones: 1) En pacientes tratados con antibióticos previamente. 2) Infecciones por microorganismos que no figuran en la lista de amplificación. 3) Cuando existe una infección mixta. 4) Identificación según criterios fenotípicos, fundamentalmente bioquímicos frente a genotípicos. 5) Error de interpretación de los *melting peaks* por parte del software para especies cuyos productos de amplificación poseen temperaturas de *melting* similares. Todas estas discrepancias pueden explicar las diferencias en casos individuales, pero ocurren raramente en la aplicación rutinaria al diagnóstico de los métodos moleculares. En cualquier caso, la combinación de los test moleculares con los datos de la historia clínica junto con los resultados de los cultivos convencionales, facilitarán un diagnóstico más preciso, además de precoz, y permitirán realizar un seguimiento más completo en estos pacientes.

Es importante destacar que en este estudio comparativo del primer grupo control de pacientes con un segundo grupo intervencionista para la evaluación del impacto clínico y de *SeptiFast*, la metodología de extracción de ácidos nucleicos empleada fue la técnica manual original, mediante el *SeptiFast* Prep Kit, en las muestras de ambos grupos. Nuestra propuesta de automatización de la técnica de extracción de ADN obtiene mayor sensibilidad en su aplicación clínica y además acorta el proceso total en 3 h. La información más precisa y temprana que se hubiese podido aportar al segundo grupo mediante la aplicación de la técnica modificada, presumiblemente habría proporcionado aún mejores resultados a nuestro estudio.

Otra cuestión a considerar, es la necesidad de dar indicaciones clínicas precisas sobre cuándo utilizar la prueba.²⁹¹⁻²⁹³ Es evidente que no todos los pacientes se benefician por igual de la utilización de enfoques de diagnóstico molecular.²⁹⁴ La utilidad de la prueba depende del estado clínico del paciente debido a que la muestra de sangre debe reflejar adecuadamente el compartimento que se va a analizar, a modo de ejemplo resulta ineficaz solicitar *SeptiFast* en

pacientes sépticos con cuadros meníngeos extrahospitalarios en los que los agentes infecciosos con mayor frecuencia implicados son: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* o *Listeria monocytogenes* y que a excepción *Streptococcus pneumoniae* no se encuentran dentro de la lista de identificación de la técnica. Esta misma situación ocurre cuando en patologías habitualmente con alta prevalencia de anaerobios u otro tipo de microorganismos no incluidos en *SeptiFast*. Es preciso tener en cuenta que en bacteriemias transitorias, biopelículas, y patologías bacterianas con niveles bajos pueden afectar la capacidad de la prueba de detección (endocarditis o pacientes neutropénicos).²⁹⁵ Recientemente nos hemos encontrado con una inhibición del control de los Gram negativos y que en algunos trabajos han solucionado disminuyendo la cantidad de control,²⁹⁶ desde nuestro punto de vista el control esta inestable y pudiera deberse a un defecto del lote, actualmente está en estudio, de cualquier manera no afecta a la identificación de hongos que en algún caso clínico con aspergilosis invasiva ha resultado de gran utilidad. A pesar de algunas limitaciones que requieren juicio profesional, el uso de técnicas de diagnóstico molecular representa una mejora global en términos de proporcionar apoyo bien fundamentado de decisiones clínicas de tratamiento. **Es imprescindible una estrecha colaboración clínico-microbiólogo en la toma de decisiones conjuntas de forma individualizada en beneficio del paciente.**

En conclusión, nuestro estudio ha demostrado que SeptiFast con Magna extracción compacta pura reduce el flujo de trabajo de 6. 54 hrs. a 3.56 hrs. cuando se compara con SeptiFast con la extracción manual convencional. La principal ventaja de SeptiFast MPC es acortar el intervalo de respuesta diagnóstica, la identificación temprana del agente etiológico es de extrema importancia en los pacientes sépticos permite adecuar la terapia empírica de forma precoz en consecuencia, disminuye de la mortalidad, se reducen las posibles complicaciones del paciente séptico, disminuye la estancia hospitalaria y los costes sanitarios. En nuestra experiencia, el uso combinado de las pruebas moleculares rápidas y microbiología convencional representa una ventaja para el paciente séptico y mejora la toma de decisiones clínicas para lograr un tratamiento adecuado.

6.3 Rendimiento económico de SeptiFast en pacientes con sepsis. Estimación de costes. Consumo de recursos

El significativo ahorro en el gasto que se consigue con SeptiFast como consecuencia de la disminución de días de estancia en la UCI y la menor necesidad de antibióticos empíricos gracias al diagnóstico precoz. La relevancia clínica y económica de la sepsis severa y el shock séptico son de tal magnitud, por sus frecuentes complicaciones, alta mortalidad y estancias prolongadas en UCI y el hospital ²⁹⁷ que los test microbiológicos que faciliten decisiones clínicas más rápidas y específicas, representan un avance importante. Aunque la reducción de la mortalidad es obviamente un objetivo fundamental para cualquier técnica diagnóstica o terapéutica aplicada a la sepsis, la reducción de los costes supone también una consideración a tener en cuenta, como se deduce de los 450.000 casos tratados cada año en Europa y un coste estimado de 345 millones de € solamente en España. ²⁹⁸ Por otro lado, el ingreso en la UCI implica intrínsecamente un riesgo asociado de mayor exposición a patógenos, en pacientes con la alta vulnerabilidad que caracteriza a la sepsis y el shock séptico. Consecuentemente, una reducción de dicha exposición debería de considerarse como un factor positivo para el pronóstico de estos pacientes.

Las estrategias basadas en tratamientos de amplio espectro con frecuencia conllevan la administración innecesaria de antibióticos y su mantenimiento hasta la obtención de los resultados microbiológicos. La posibilidad de reducir este uso de antibióticos innecesarios aporta importantes ventajas económicas, pero particularmente disminuye inconvenientes de índole médica como sus efectos iatrogénicos y el riesgo de generar resistencias a los antimicrobianos en el hospital. ²⁹⁹⁻³⁰² En nuestro estudio los pacientes en el grupo control recibieron una media de $5,1 \pm 3,1$ antibióticos frente a $4,2 \pm 2,2$ en el segundo grupo (Tabla 11) lo que representa una disminución importante en el uso de estos fármacos, y más aún en lo que se refiere a sus costes económicos.

La reducción y la consecuente racionalización del uso de antibióticos para planificar una política adecuada en el hospital se puede ver facilitada por el uso combinado de las nuevas técnicas de diagnóstico. El aumento en las resistencias bacterianas tiene como consecuencia una disminución de la eficacia de los antibióticos en las UCI (entendida como su capacidad de alcanzar blancos farmacodinámicos). ³⁰³ El advenimiento del diagnóstico

genotípico en el manejo de los pacientes sépticos y la consecuente disminución en el número de antibióticos utilizados avocará a un menor desarrollo de resistencias sin perder eficacia clínica en el tratamiento.

El alto coste del tratamiento antibiótico supone un importante capítulo económico para los gastos del hospital, sin embargo el volumen de gasto atribuible a la estancia del paciente en la UCI y a la estancia hospitalaria en general es de mayor magnitud. Por lo tanto, el ahorro en los días de ingreso, representa el beneficio más significativo observado en nuestra evaluación sobre el impacto clínico y económico de la incorporación de *SeptiFast* al diagnóstico de la sepsis.

6.4 Posible influencia del polimorfismo C-159-T en el promotor de CD14 en nuestro medio sobre la mortalidad

La influencia de este polimorfismo en la presentación y la evolución de muchas patologías ha sido debatida recientemente, pero su participación en los procesos inflamatorios no es independiente sino que forma parte de un complejo conjunto de interacciones en las que también participan otros elementos del sistema inmune, así como diversas condiciones medio-ambientales que no son reproducibles en todos los estudios que evalúan sus efectos ³⁰⁴ Desde este punto de vista, nosotros hemos estudiado la influencia en nuestro medio sobre la mortalidad de nuestros pacientes y hemos podido apreciar que es mayor en la variante TT o bien que la forma CC ejerce un efecto protector, mientras que los heterocigotos presentan valores intermedios. Como decíamos antes, las variantes de este polimorfismo no se encontraban distribuidas homogéneamente en los dos grupos del estudio, habiendo un predominio de los homocigotos CC en el primer grupo (36,5%) sobre el segundo (16,66%) Tal vez esta diferencia pueda colaborar a explicar por qué no disminuyó la mortalidad en el grupo intervencionista en relación al observacional, pues en nuestro medio la variante CC parece tener un efecto protector que aumenta la supervivencia en sus portadores.

6.5 Diagnóstico de la infección polimicrobiana

Las recomendaciones de las directrices más recientes sobre el tratamiento de la sepsis aconsejan iniciar un tratamiento antibiótico de amplio espectro en la primera hora después del reconocimiento del caso⁹ con el ajuste de dicha terapia en cuanto el patógeno causal sea identificado. Pero por el momento, el diagnóstico etiológico de la sepsis se fundamenta principalmente en el hemocultivo, técnica que entre otras limitaciones ofrece una baja sensibilidad para la detección de infecciones polimicrobianas.¹⁵⁷ La lentitud en el crecimiento de algunas cepas bacterianas y especialmente de muchas especies fúngicas, dificultan su hallazgo en común con otras de más rápido desarrollo o que se encuentren en mayor proporción en el inóculo inicial, de manera que la ventaja proliferativa de alguno de los microorganismos puede enmascarar la presencia de otros de más lento desarrollo o dificultar su reconocimiento e identificación. El efecto, ya comentado anteriormente, de tratamientos previos a la toma de muestras que puedan inhibir el crecimiento de algún microorganismo presente, puede colaborar a ocultar su presencia especialmente si coexiste con otro menos sensible a la acción del antimicrobiano. Por otro lado, el hemocultivo precisa de varios pasos posteriores a la incubación, una vez obtenido el crecimiento de las colonias de los gérmenes en desarrollo, que añaden una mayor complicación al reconocimiento de las infecciones causadas por varios microorganismos, pues es necesario reconocer y aislar distintas colonias crecidas en un mismo medio. El tiempo total de su identificación se alarga y habrá que recurrir a diversas técnicas de identificación bioquímica a expensas de una mayor manipulación, con el riesgo de un mayor número de fuentes de error.

La PCR a tiempo real puede solventar, al menos parcialmente, estas dificultades. Es cierto que la proximidad en los *melting peaks* de algunos de los microorganismos podría dificultar su reconocimiento en el revelado de la PCR mediante las curvas de *melting*, pero las sondas FRET, de pequeño tamaño diseñadas para SeptiFast y su especificidad para las dianas de las regiones ITS, permiten un margen de varios grados de diferencia en los *melting peaks* que hace improbable un solapamiento completo entre ellos. Nuestra experiencia nos ha permitido comprobar que el *software* de SeptiFast ha sido capaz de reconocer distintos productos de amplificación en una misma reacción, en casos en los que el hemocultivo no pudo obtener este diagnóstico de coinfección. Por otro lado, la detección de varios microorganismos por un sistema que se amplifica con cebadores universales, convierte el

proceso de amplificación en un proceso competitivo. Los cebadores compiten en su unión con el ADN objetivo, el CI y con pequeñas cantidades de microorganismos que amplifican con cebadores comunes. La presencia de un microorganismo en elevada cantidad en la muestra inicial podría llevar al consumo de los cebadores alcanzando la fase de saturación de la PCR de tal forma que el microorganismo minoritario no sería amplificado. Este posible efecto indeseable guarda cierta analogía con la diferente capacidad de proliferación de distintos gérmenes en hemocultivo o con su presencia en el mismo en cantidades muy desiguales. Sin embargo en el caso de la PCR puede tener también consecuencias beneficiosas como, en los casos ya comentados, de microorganismos contaminantes procedentes de la piel y presentes en bajas concentraciones, que de amplificarse, lo harán con un bajo C.P.

En cualquier caso, la dificultad teórica tanto para la distinción de *melting peaks* como para la competencia por los cebadores, ocurriría solamente cuando los microorganismos causantes de una coinfección fuesen blanco de una misma reacción de PCR; pero *SeptiFast* consiste en tres PCR diferentes realizadas en tres capilares independientes del LightCycler 2.0, por lo tanto no hay ningún tipo de interferencia cuando los gérmenes infecciosos pertenecen a los distintos grupos de las reacciones de PCR. Esto es de especial relevancia cuando coexiste una infección fúngica con una bacteriana, lo que ocurrió en 8 de los 41 casos de infecciones múltiples detectados en nuestro estudio sobre 500 pacientes (Tabla 24) puesto que la PCR para hongos y levaduras se lleva a cabo en un capilar independiente evitando interferencias con las bacterias. Las infecciones fúngicas ofrecen mayor dificultad para el desarrollo en hemocultivo debido al lento crecimiento de estos microorganismos o a la imposibilidad de obtener su desarrollo a partir de muestras de sangre como ocurre en la aspergilosis invasiva. Dificultad que se vería incrementada por la presencia de otros gérmenes formando parte del cuadro infeccioso.

Las limitaciones de *SeptiFast* vienen determinadas por la presencia de microorganismos no incluidos en su espectro, especialmente cuando se trata de bacterias anaerobias. No obstante, estas no suelen ser causa frecuente de resistencias inesperadas que condicionen la eficacia del tratamiento empírico inicial, que de todas formas puede ser revisado oportunamente cuando los resultados del hemocultivo lo permitan. En nuestro estudio esta circunstancia sólo se ha dado en uno de los 12 casos de infección polimicrobiana detectados a partir del hemocultivo.

La prontitud de la información aportada por *SeptiFast* como ayuda para la corrección de tratamientos iniciales no adecuados se ve reforzada, en los casos de infección múltiple, por la mayor sensibilidad de la PCR sobre el hemocultivo cuando se trata de revelar la presencia de varios gérmenes implicados simultáneamente en un mismo cuadro clínico. El diagnóstico de estos casos por PCR conlleva, por tanto, todavía más ahorro de tiempo en su reconocimiento con respecto al ya considerable avance que se consigue en las infecciones causadas por un solo agente etiológico

6.6 Diagnóstico molecular de Aspergilosis invasiva

Debido a su ubicuidad, el crecimiento de AF se encuentra con frecuencia en los cultivos microbiológicos convencionales de las muestras respiratorias de pacientes que no padecen AI, de manera que su aislamiento no posee valor diagnóstico. Sin embargo su cultivo en muestras de sangre es de muy escasa sensibilidad, incluso en pacientes con infección diseminada. La sospecha clínica de esta enfermedad, de sintomatología inespecífica y variable, debe de ser confirmada por técnicas de imagen como TAC o RMN y la demostración de la infección por este hongo precisa a menudo de un estudio histopatológico de muestras obtenidas por biopsia o aspiración en las que se pueda observar las hifas invadiendo el tejido, o su cultivo en una muestra estéril (excluyendo orina, muestras de senos paranasales o lavado broncoalveolar) junto con los hallazgos radiológicos.²⁵⁹

La amplificación de ADN de AF mediante PCR representa una alternativa equivalente al cultivo de una muestra estéril para el diagnóstico de AI, pero las técnicas moleculares en uso hasta la fecha generalmente requieren de algunos pasos complejos, como la secuenciación del producto amplificado para la identificación del hongo, que dificultan su empleo como métodos de rutina en un laboratorio clínico, especialmente cuando se necesita un diagnóstico precoz.

SeptiFast ha demostrado su utilidad para amplificar e identificar ADN de AF en muestras de sangre en el mismo *screening* en el que se investiga la presencia de las principales bacterias y levaduras que participan en los cuadros sépticos. La sensibilidad alcanzada en nuestro estudio para el diagnóstico de AI fue 77,77% con una especificidad de 70% en contraposición a los hemocultivos, que por regla general no consiguen el desarrollo

de estos hongos a partir de las muestras de sangre. *SeptiFast* posee además el valor añadido del diagnóstico diferencial frente a otros procesos infecciosos que pueden ser detectados en el mismo ensayo o la posibilidad de la detección simultánea de AF junto con otros microorganismos.

6.7 Diagnóstico molecular de Endocarditis infecciosa

Trabajos previos han demostrado que la amplificación del gen 16S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) mediante PCR utilizando cebadores de amplio intervalo es una técnica más sensible que el hemocultivo y el cultivo de tejido valvular para el diagnóstico etiológico de la EI ya que logra un rastreo universal, si bien su uso sistemático está restringido a algunos laboratorios debido a su complejidad.³⁰⁵⁻³⁰⁷

El test *SeptiFast* amplifica el espaciador transcripcional interno (ITS) en la región del gen ARNr y su ventaja se basa en la simplicidad y el tiempo reducido de respuesta, pero, a diferencia de los cebadores universales, *SeptiFast* sólo detecta ADN de los microorganismos cuya secuencia diana está incluida y no es capaz de identificar todos los posibles gérmenes causantes de EI.

SeptiFast en sangre de pacientes con EI ha demostrado una sensibilidad similar al hemocultivo para estreptococos, enterococos y *Staphylococcus aureus*.³⁰⁸⁻³⁰⁹ En nuestra serie el hemocultivo positivo supuso el 80% de los casos frente al 60% *SeptiFast* en sangre estos. El análisis global que en principio pudieran considerarse no rentable cambia considerablemente al hacer un estudio en profundidad de cada caso específico.

El *SeptiFast* puede detectar ADN bacteriano en circulación, por lo que en los casos de EI tratados con antiinfecciosos y con hemocultivo negativo, puede detectar el microorganismo sin necesidad de que este se viable (casos 3 y 4). No obstante cuando el periodo de tratamiento antibiótico transcurrido entre el hemocultivo y el *SeptiFast* fue de más de 5 días puede darse el fenómeno contrario en pacientes con EI activa se obtenga un hemocultivo positivo y días después un *SeptiFast* en sangre negativo aunque coexistan vegetaciones con ADN bacteriano. (Casos 6-9 y 14-15).

Se ha descrito una menor sensibilidad de *SeptiFast* en sangre frente a estafilococos coagulasa negativos (CoNS) respecto al hemocultivo³¹⁰ puede deberse a una baja concentración de ADN bacteriano en sangre secundaria a la liberación enlentecida de ADN desde las vegetaciones a la circulación o a la inactivación del ADN(12.) diagnóstico de sepsis y ha prefijado un punto de corte de sensibilidad relativamente alto para el ADN de los CoNS y estreptococos, de modo que las concentraciones bajas no se consideran positivas. La programación del *software* pretende filtrar los casos de bacteriemia transitoria contaminante en relación con técnicas invasiva, catéteres intravenosos, sonda propias de las unidades de críticos.²⁹⁵ En nuestra experiencia, consideramos que los portadores de prótesis valvulares, donde los CoNS son el principal agente etiológico de la EI postoperatoria precoz, cada caso debe ser valorado conjuntamente entre el clínico y el microbiólogo para discriminar entre contaminante o patógeno.

En este sentido, nuestros pacientes 5, 10 y 11 presentaban endocarditis precoz sobre prótesis y *SeptiFast* en sangre detectó ADN de CoNS, pero el *software* de identificación lo interpretó como posible contaminación, mientras que los hemocultivos y *SeptiFast* del tejido valvular resultaron positivos.

La sensibilidad de *SeptiFast* en las vegetaciones fue del 100%, mientras que para el cultivo del tejido valvular fue del 33,3%, similar a lo observado con otras técnicas moleculares (2-4). En nuestra serie, pudimos comprobar, al igual que otros autores³¹¹ que la sensibilidad de la PCR no se afecta por el tiempo de tratamiento anti infeccioso administrado antes de la cirugía. Este hecho puede ser debido a que el aclaramiento del ADN procedente de bacterias viables o no viables presentes en la vegetación es lento, y puede persistir ADN bacteriano hasta varios años después de completar el tratamiento antinfeccioso.³¹¹

Por último la mayor ventaja del *SeptiFast* en tejido valvular es que permite obtener el resultado en unas 3h30m-4h. después de la cirugía frente a 4-5 días en el caso de que el cultivo sea positivo o 15 días que precisa ser incubado en el caso de que este sea negativo. Esta circunstancia permite tomar decisiones terapéuticas a las pocas horas de la intervención, resulta especialmente llamativo en caso de endocarditis fúngicas donde el crecimiento es mucho más lento, *SeptiFast* anticipa el diagnóstico a nivel de especie en 5 días en caso de los hongos levaduriformes y unos 7 días en caso de el *Apergillus fumigatus*, lo que hemos podido comprobar en el seguimiento diario de nuestro hospital una vez instaurada la técnica de rutina,

eso sí, el cultivo hoy por hoy es el unico método que nos permite realizar estudios de sensibilidad y como ya se indicó. *SeptiFast* está diseñado para identificar un grupo amplio de especies bacterianas y fúngicas, pero no detecta otros posibles patógenos de la EI, como el grupo HACEK, *Gemella*, *Coxiella* y *Bartonella* que precisarían de otras técnicas diagnosticas por consiguiente, un *SeptiFast* negativo no descarta EI.

6.8 Aplicaciones específicas en las que la PCR pudiera aportar un mejor apoyo en el diagnóstico de la sepsis

La velocidad es de vital importancia en el diagnóstico de la sepsis, actualmente se considera una carrera a muerte entre los patógenos y el sistema inmune del huésped.³¹² En los pacientes en estado crítico, el diagnóstico de infección en el torrente sanguíneo, supone un gran desafío, Las técnicas convencionales de diagnóstico son lentas y la demora en el tratamiento supone un aumento de la mortalidad de forma lineal cuando la terapia empírica adecuada no es administrada en las primeras horas. Los métodos moleculares proporcionan una identificación más rápida que facilita la toma de decisiones clínicas y terapéuticas.³¹³

Los pacientes ingresados con un alto riesgo de infección como críticos, trasplantados que habitualmente se encuentran con antibioterapia previa, pueden desarrollar infecciones nosocomiales por microorganismos multiresistentes, la terapia a la que se encuentran sometidos normalmente interfiere con el crecimiento de los mismos, *SeptiFast* detecta ADN circulante puede identificar el microorganismo, aunque este no sea viable en cultivo. El intervalo diagnóstico se acorta especialmente en caso de sobreinfección fúngica, en nuestro hospital ha supuesto un adelanto en el diagnóstico de 5-7 días frente a las técnicas de diagnóstico convencional.

Puede resultar de útil en el diagnóstico de la infección nosocomial. Se ha aplicado la técnica en pacientes con cobertura antibiótica que tras la realización de maniobras invasivas, presentan fiebre persistente con datos clínicos de infección, que no responde al tratamiento antibiótico y en los que todas las técnicas de diagnóstico microbiológico convencional fueron negativas. Se realizo en muestras de (LCR en intervenciones de Neurocirugía, LCR (derivaciones), en líquido amniótico despues de realización de procedimientos quirúrgicos en tratamientos de fertilidad, líquido de diálisis peritoneal, L.pericárdico y L.pleural).

Al igual que en otros estudios,³¹³⁻³¹⁴ se ha empleado en el diagnóstico de infección como complemento del hemocultivo, actualmente se está investigando en situaciones de difícil diagnóstico como e en muestra quirúrgicas del material periprotésico.³¹⁵ En Traumatología es de vital importancia distinguir entre aflojamiento o infección de la prótesis, normalmente, a los pacientes se le ha administrado antibioterapia previa a la intervención de recambio de prótesis, lo que dificulta el crecimiento de los microorganismos en los medios convencionales. Los microorganismos más frecuentemente implicados en la infección de prótesis se encuentran dentro de las bacterias analizadas por *SeptiFast*, puede resultar de interés en estas patologías.

Otras situaciones en las que pudiera ser útil son en el rastreo de pacientes con posibles bacteriemias por microorganismos causantes de brotes nosocomiales, donde habitualmente se requiere tratamiento específico y aislamiento para el control de la infección.

Las directrices futuras en el diagnóstico de la sepsis pasan por el diseño de paneles con múltiples microorganismos que contengan genes de resistencia³¹⁶ y biomarcadores de diagnóstico precoz, así como un software que permita al microbiólogo dirigir el diagnóstico a según la sospecha clínica y por supuesto el gran caballo de batalla a un coste asequible. Sin embargo, incluso el nuevo enfoque tecnológico más prometedor, no se traduce en mejoras notables en el manejo del paciente si no se implementa como parte de los algoritmos más grandes que deben basarse en la estrecha interacción entre el clínico y el microbiólogo.³¹⁴

7. CONCLUSIONES



7.1 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1º-El **SeptiFast** (ROCHE) no sustituye a los métodos de diagnóstico habituales, es menos sensible, identifica 25 los microorganismos y se precisa cultivo para realizar estudios de sensibilidad. No obstante al detectar ADN, diagnóstica bacteriemias con patógenos no viables en cultivo lo que la convierte en una técnica complementaria del hemocultivo.

2º-El desarrollo de un método automatizado basado a en nanopartículas magnéticas es una revolución metodológica, resulta menos laborioso, reduce considerablemente las contaminaciones, el tiempo de trabajo y el tiempo de detección e identificación del sistema molecular.

3º-La obtención de ADN final de las cepas control por ambos métodos es óptima. En el sistema automatizado recupera menor volumen final pero más concentrado.

4º-. El método automatizado **MagNA PureCompact** obtuvo mayor sensibilidad que **SeptiFast Prep Kit**. al compararlo con el hemocultivo, sensibilidad del 92%, posiblemente promueve una mayor interacción por fuerzas de Van der Waals de carácter atractivo entre la superficie de las nanopartículas y el ADN.

5º-En la mayoría de muestras clínicas el ADN genómico no interfiere con la extracción automatiza pero si contienen un exceso de carga genómica, puede saturarse la polimerasa y no detectarse el ADN, en estos casos, deben realizarse diluciones seriadas a 1:2 para su recuperación.

6º- **SeptiFast MagNA PureCompact** resulta especialmente útil en pacientes críticos y en bacteriemias con cultivos negativos. La principal ventaja es la rapidez en el diagnóstico muy superior a las técnicas convencionales, permite adecuar la terapia empírica en las primeras horas de la sepsis incluso sospechar el diagnóstico del cuadro clínico.

7º-La antibioterapia adecuada precoz supuso un considerable descenso en la estancia media hospitalaria tanto en UCI como en especialidades y una reducción considerable en el consumo de antibióticos .En datos globales un ahorro sanitario de 12.096 € por paciente.

8º.-Los factores genéticos juegan un papel importante en la sepsis. La variante TT del polimorfismo CD4 se asocia con mayor mortalidad. Se podría emplear como marcador pronóstico.

9º.- **SeptiFast** es más sensible que el hemocultivo en las confecciones sobre todo si están implicados microorganismos de lento crecimiento como hongos, pero presenta limitaciones en las bacteriemias mixtas con anaerobios, ya que no se incluyen en el panel.

10º.- En las infecciones fúngicas la utilidad de **SeptiFast** es máxima, en el diagnóstico de la aspergilosis invasiva, detecta sin dificultad *A.fumigatus* que no crece de forma habitual en hemocultivos. En la candidiasis invasiva se anticipa al cultivo los entre 5-7 días e identifica a nivel de especie, lo que permite adecuar el antifúngico específico en las micosis más frecuentes. No obstante no detecta otras especies fúngicas por lo que no excluye el cultivo.

11º.-La sensibilidad en el tejido valvular es del 100% para los microorganismos incluidos en el panel, permite pautar tratamiento adecuado a las pocas horas de la intervención pero no detecta otros posibles patógenos de la EI, como el grupo HACEK, *Gemella*, *Coxiella* y *Bartonella*, por consiguiente, un **SeptiFast** negativo no descarta EI.

12º- Las investigaciones de futuro en la sepsis, pasan por el diseño equipos de diagnóstico rápido que integren *software* que permitan redirigir el flujo de trabajo según la sospecha clínica hacia determinaciones de PCR o plataformas de secuenciación masiva que sean capaces de identificar, microorganismos patógenos, principales genes de resistencia, genes de pronóstico y biomarcadores de diagnóstico rápido lo que nos permitiría, aplicar la terapia empírica basada en la evidencia de forma precoz.

7.2 CONCLUSION GENERAL .RESUMEN FINAL

La sepsis es una enfermedad emergente tiempo dependiente. El desarrollo de un método de diagnóstico molecular automatizado basado en nanopartículas magnéticas que acorta el intervalo diagnóstico es una herramienta muy útil en las unidades de críticos, permite adecuar la terapia empírica en las primeras horas, reduce la mortalidad de forma lineal, el tiempo de estancia hospitalaria, el consumo de antibióticos y los costes sanitarios. No obstante, ninguna herramienta es tan potente como la habilidad clínica de expertos en el diagnóstico de la infección.

El microbiólogo debe formar parte de un equipo multidisciplinar junto con las unidades de críticos, la valoración conjunta de los casos clínicos de forma individualizada, permite gestionar los recursos disponibles, emitir los resultados con prontitud y aconsejar la antibioterapia adecuada, a fin de cuentas, la sepsis es una carrera a muerte contra los microorganismos por conseguir el trofeo más preciado. **La vida.**



8.- BIBLIOGRAFÍA



1. Lundberg JS, Perl TM, Wiblin T, Costigan MD, Dawson J, Nettleman MD et al. Septic shock: an analysis of outcomes for patients with onset on hospital wards versus intensive care units. *Crit Care Med* 1998; 26: 1020-4.
2. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:379–414
3. Majno G. The ancient riddle of sepsis. *J Infect Dis* 1991;163:937–945.
4. Baron R M, Baron M J, Perella M A. Pathobiology of sepsis. Are we still asking the same questions? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 129-134.
5. Kaufmann SHE. Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med* 2005; 353:2423–2426
6. Dellinger, R. Cardiovascular management of septic shock. *Critical Care Medicine*. 2003. Volume 31. Number 3.)
7. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definition of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*. 1992; 101: 1644-1655
8. Levy MM, Fink MP, Marshall JC Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definition Conference. *Crit. Care Med*. 2003; 31: 1250-6
9. Dellinger RP1, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL; International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee; American Association of Critical-Care Nurses; American College of Chest Physicians; American College of Emergency Physicians; Canadian Critical Care Society; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; European Society of Intensive Care Medicine; European Respiratory Society; International Sepsis Forum; Japanese Association for Acute Medicine; Japanese Society of Intensive Care Medicine; Society of Critical Care Medicine; Society of Hospital Medicine; Surgical Infection Society; World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 *Crit Care Med*. 2008 Apr; 36 (4): 1394-6

10. Dellinger RP, Levy MM, Rodas A, Annane D ,Gerlach H, Opal SM, Servansky JE, Sprung CL ,Douglas ES,Jaescheke Osborn TM , Nunnally ME ,Townsend SD, Reinhart K , Kleinpell RM, AngusDC, Deustchman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S ,Beale JR, Vicente JL ,MorenoR. and the Pediatric Subgroup Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sever Sepsis and Septic Shock:2012 Critical Care.Medicine February 2013 • Volume 41 • Number 2
11. C. León Gil, L.Garcia-Castillo Riesgo, M.S .Moya Mir, A.Artigas Ravéntos, M.Borges Sa F.J.CandelGonzalez, M Chanovas Borrás, R.Ferrer Roca, A. Juli'n Jiménez, A. Loza Vazquez M.Sánchez García.Documento consenso (SEMES-SEMICYUC) Recomendaciones del manejo diagnóstico-terapéutico Inicial y multidisciplinario de la sepsis grave en los Servicios de Urgencias Hospitalarios Emergencias 2007; 19:260-272.
12. Alonso Salas MT de Carlos Vicente Juan Carlos ,Gil Antón J , Pinto Fuentes I ,Quintilla Martínez JMe,Sánchez Díaz JI Documento de consenso SECIP-SEUP sobre manejo de sepsis grave y Shock séptico en Pediatría
13. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med. 1992; 20: 864–74.
14. Sprung CL, Sakr Y, Vincent JL, Le Gall JR, Reinhart K, Ranieri VM, Gerlach H, Fielden J, Groba CB, Payen D.An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence In Acutely Ill Patients (SOAP) study. Intensive Care Med. 2006; 32:421–27.
15. Vicente JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change Lancet. 2013 02 de marzo; 381 (9868): 774-5.
16. Declaración día mundial sepsis .Global sepsis alliance <http://globalsepsisalliance.com/>
17. Adriene G Randolph y Russell J McCulloh:Pedriatic Sepsis:Important considerations for diagnosing and managing sever infections in infants, children, an adolescents Virulence Jan 1,2014;5(1):1979-189
18. Sociedad Española de Medicina Intensiva Critica y Unidades Coronarias SEMYUC <http://www.semicyuc.org/>
19. Leandro U Taniguchi,Ana Luiza Bierrenbach,Cristina M Toscano, Guillermo PP Schentino and Luciano CP Azevedo.Sepsis-related deaths in Brazil: an Analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010 *Critical Care* 2014, **18**:608

20. Angus DC, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013, 369:840–851
21. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303-10.
22. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35 :1244–1250
23. Ayala-Ramírez OH, Domínguez-Berjón MF, Esteban-Vasallo MD: Trends inhospitalizations of patients with sepsis and factors associated with inpatient mortality inthe Region of Madrid, 2003-2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014, 33:411–421
24. Martin GS: Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcome. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012, 10:701–706
25. Carbajal-Guerrero, A. Cayuela-Domínguez, E. Fernández-García, T. Aldabó-Pallás, J.A.Márquez-Vácaro, C.Ortiz-Leybaa, y J.GarnachoMontero, Epidemiología y pronóstico tardío de la sepsis en ancianos *J. M.intensiva* 2013 b<http://dx.doi.org/10.1016/J.medin.2012.12.006>
26. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, Angus DC. Infection Rate and Acute Organ Dysfunction Risk as Explanations for Racial Differences in Severe Sepsis *JAMA*. 2010; 303: 2495-503.
27. Mayr FB, Yende S, D'Angelo G, Barnato AE, Kellum JA, Weissfeld L, Yealy DM, Reade MC, Milbrandt EB, Angus DC. Do hospitals provide lower quality of care to black patients for pneumonia? *Critical Care Med*. 2010; 38: 759-65.
28. Sørensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and Environmental Influences on Premature Death in Adult Adoptees *N Engl J Med*. 1988; 318: 727-32.
29. Sirgo G, Rello J, Bodi M, Díaz E, Pérez Vela JL, Hernández G, Water G Polimorfismo genético en el paciente crítico (I). Aspectos generales, inflamación y sepsis *Med Intensiva*. 2003;27:24-31
30. Garnacho Montero M, Garnacho Montero MC, Ortiz Leiba C, Aldabó Pallás T Polimorfismos genéticos en la sepsis *Med Intensiva*. 2005;29:185-91

31. Padre Cardoso C, de Assis de Oliveira AJ, Antônio Botoni F, Isabela Cristina Porto Rezende IA, Alves Filho JC, de Queiroz Cunha F, Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau J, Luiz Alexandre Viana Magno LA, y Fabricio Ríos Santos F Interleukin-10 rs2227307 and CXCR2 rs1126579 polymorphisms modulate the predisposition to septic shock Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Jun; 110 (4): 453460.
32. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. Crit Care Med. 2001 Jul;29(7 Suppl): S109-16
33. Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, Martin GS The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. Crit Care Med. 2006 Oct; 34(10):2576-82.
34. Williams MD, Braun LA, Cooper LM, Johnston J, Weiss RV, Qualy RL, Linde-Zwirble W. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care Crit Care. 2004; 8: R291-8.
35. Florian B Mayr, Sachin Yende, and Derek C Angus Epidemiology of severe sepsis. Virulence. Jan 1, 2014; 5(1):4-11.
36. Robby Markwart , Stephanie A. Condotta , Robert P. Requardt , Farina Borken , Katja Schubert , Cynthia Weigel , Michael Bauer , Thomas S. Griffith , Martin Förster , Frank M. Brunkhorst , Vladimir P. Badovinac , and Ignacio Rubio , Philip Alexander . Immunosuppression after Sepsis: Systemic Inflammation and Sepsis Induce a Loss of Naïve T-Cells but No Enduring Cell-Autonomous Defects in T-Cell Function PLoS One. 2014; 9 (12): e11509
37. Cordula M. Stover, Ceri E. Batalla , Gareth Davies , y Phillip A. Evans Long Term Health-Related Quality of Life in Survivors of Sepsis in South West Wales: An Epidemiological Study PLoS One. 2014; 9 (12): e116304.
38. Castro RA, Angus DC, Hong SY, Lee C, Weissfeld LA, Clermont G, Rosengart MR. Light and the outcome of the critically ill: an observational cohort study. Crit Care. 2012;16: R132.
39. Danai PA, Sinha S, Moss M, Haber MJ, Martín GS. Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. Crit Care Med. 2007; 35: 410-5.
40. Fisman D, Patrozou E, Carmeli Y, Perencevich E, Tuite AR, Mermel LA; Geographical Variability of Bacteremia Study Group. Geographical variability in the likelihood of bloodstream infections due to gram-negative bacteria: correlation with proximity to the equator and health care expenditure. PLoS One. 2014 Dec 18; 9(12):e114548.

41. Wallace DJ1, Angus DC2, Seymour CW1, Yealy DM3, Carr BG4, Kurland K5, Boujoukos A2, Kahn JM2. Geographic access to high capability severe acute respiratory failure centers in the United States. *PLoS One*. 2014 Apr 4;9(4):e94057.
42. Christopher W. Seymour , Thomas D. Rea Jeremy M. Kahn, Allan J. Walkey , Donald M. Yealy , and Derek C. Angus .Severe Sepsis in Pre-Hospital Emergency Care Analysis of Incidence, Care, and Outcome.*Am J Respir Crit Care Med*. 15 de december 2012; 186 (12): 1264-1271. Published online Dec 15, 2012.
43. Suffoletto B1, Frisch A, Prabhu A, Kristan J, Guyette FX, Callaway CW Prediction of serious infection during prehospital emergency care. *Prehosp Emerg Care*. 2011 Jul-Sep; 15(3):325-30.
44. Angus DC, Pereira CA, Silva E. Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006 Jun;6(2):207-12
45. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, Honrubia T, Algora A, Bustos A, García G, Diaz-Regañón IR, de Luna RR. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med*. 2007 May;35(5):1284-9
46. Angus DC, Sirio CA, Clermont G, Bion J. International comparisons of critical care outcome and resource consumption. *Crit Care Clin*. 1997 Apr; 13(2):389-407.
47. Mallika L, Mendu ML, Zager S, Gibbons FK, Christopher KB. Relationship between neighborhood poverty rate and bloodstream infections in the critically ill. *Crit Care Med*. 2012 May; 40(5):1427-36.
48. Koch K, Nørgaard M, Schønheyder HC, Thomsen RW, Søgaaard M; Danish Collaborative Bacteremia Network. Effect of socioeconomic status on mortality after bacteremia in working-age patients.*PLoS One*. 2013 Jul 25; 8(7):e70082.
49. Vathesatogkit P, Batty GD, Woodward M. Socioeconomic disadvantage and disease-specific mortality in Asia: systematic review with meta-analysis of population-based cohort studies. *J Epidemiol Community Health*. 2014 Apr;68(4):375-83.
50. Kwiatkowski D1. Genetic dissection of the molecular pathogenesis of severe infection. *Intensive Care Med*. 2000;26 Suppl 1:S89-97
51. Cisneros-Herreros J.M., Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lleti M.Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. *Guías de la SEIMC.Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; 25 (2): 111-30.

52. Siegman-Igra Y, Forer B, Orni-Wasserauf R, Golan Y, Noy A, Schwartz D, et al. Reappraisal of community-acquired bacteremia: A proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 1431-9
53. de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Sep; 19(9):860-8.
54. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009 Dec 2; 302(21):2323-9. B.
55. Bouza C, López-Cuadrado T, Saz-Parkinson Z and María Amate-Blanco JM. Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: a nationwide population-based analysis (2006-2011) *BMC Infectious Diseases* 2014, 14:3863
56. EPINE 2014 <http://hws.vhebron.net/epine/>
57. Bosmann M, Ward PA. The Inflammatory Response in Sepsis. *Trends Immunol*. 2013 Mar; 34(3): 129–136.
58. Ward PA. and Bosmann. A Historical Perspective on Sepsis. *Am J Pathol*. 2012 Jul; 181(1): 2–7.
59. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013 Mar; 13(3): 260–268.
60. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and Adverse Outcomes from Critical Illness. *Pediatr Clin North Am*. 2008; 55 : 647-68,
61. Wang H, Ma S. The Cytokine storm and factors determining the sequence and severity dysfunction multiple organ dysfunction syndrome . *Am J Emerg Med*. 2008; 26 : 711-5.
62. Katherine E. Kollef; Garrett E. Schramm, PharmD; Angela R. Wills, PharmD; Richard M. Reichley, RPh; Scott T. Micek, PharmD; Marin H. Kollef, MD, FCCP Predictors of 30-Day Mortality and Hospital Costs in Patients With Ventilator-Associated Pneumonia Attributed to Potentially Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria *Chest*. 2008; 134(2):281-287

63. Heininger A, Haeberle H, Fischer I, Beck R, Riessen R, Rohde F, Meisner C, Jahn G, Koenigsrainer A, Unertl K, et al. Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2011; 15:R77.
64. Bordes J, Goutorbe P, Moncriol, Herry Boret, Danzet E, Meaudre E. Cytomegalovirus reactivation in critically ill burn patients: it's time to worry about it! *Crit Care*. 2014; 18(1): 410. doi: 10.1186/cc13742
65. Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med*. 2009; 15: 496–7. doi: 10.1038/nm0509-496.
66. Boomer SJ Grem M.J .Hotchkiss RS. The changing system in sepsis . Is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence*. 2014 Jan 1; 5(1): 45–56
67. Kumar H1, Kawai T, Akira S.Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011 Feb;30(1):16-34 B
68. Kumar S1, Ingle H, Prasad DV, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol*. 2013 Aug; 39(3):229-46. B
69. Melchjorsen J. Learning from the messengers: innate sensing of viruses and cytokine regulation of immunity - clues for treatments and vaccines. *Viruses*. 2013 Jan 31;5(2):470-527
70. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*. 2011 Oct 7; 334(6052):98-101.
71. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity *Immunol Rev*. 2012 Jul; 248(1):188-204.
72. Andersson U, Tracey KJ Reflex principles of immunological homeostasis *Annu Rev Immunol*. 2012;30:313-35
73. Opal SM Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med*. 2000 Sep; 28(9 Suppl):S77-80.
74. Opal SM, Dellinger RP, Vincent JL, Masur H, Angus DC. The next generation of sepsis clinical trial designs: what is next after the demise of recombinant human activated protein C? *Crit Care Med*. 2014; 42:1714–21.
75. Davidson CJ, Tuddenham EG, McVey JH. 450 million years of hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul; 1(7):1487-94.

76. Fiusa MM, Carvalho-Filho MA, Annichino-Bizzacchi JM, De Paula EV Causes and consequences of coagulation activation in sepsis: an evolutionary medicine perspective. *BMC Med.* 2015 May 6; 13: 105.
77. Lupu F, Keshari RS2, Lambris JD3, Coggeshall KM4 Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thromb Res.* 2014 May; 133 Suppl 1:S28-31.
78. Kelly A. Cawcutt, MD, and Steve G. Peters, MD Severe Sepsis and Septic Shock: Clinical Overview and Update on Management *Mayo Clin Proc.* November 2014;89(11):1572-1578
79. Ballesteros MA , E. Miñambres E , M.C. Fariñas MC Sepsis y shock séptico *Medicine.*2014;11:335263 Vol.11 Núm.57
80. Annane.D, Bellissant.E, Cavaillon JM. Septic shock .*Lancet.* 365 (2005), pp. 63-78
81. B. Roca Sepsis y síndromes relacionados *Rev Med Iniv Navarra REV ME/Vol 52, Nº4,* 2008, 3-14
82. Indira Briceño M.D. Sepsis: Etiología, Manifestaciones Clínicas y Diagnóstico. *Medicrit* 2005; 2(9): 203–213
83. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D; Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006 Feb; 34(2):344-53.
84. Guidet B, Aegerter P, Gauzit R, Meshaka P, Dreyfuss D; CUB-Réa Study Group. Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis. *Chest.* 2005 Mar; 127(3):942-51.
85. Vincent JL, De Backer D. Circulatory shock. *N Engl J Med.* 2013 Oct 31; 369(18):1726-34.
86. Aguado, J.M., Fortún, J. Protocolo clínico de la SEIMC: Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia.
87. Mandell Douglas Bennett. Síndrome de sepsis 5ª edición. Editorial Médica Panamericana
88. Pujol Rojo M. Leon Gil C.Sepsis sepsis grave y shock séptico:En LeV.Ausina Ruíz V, Moreno Guillén.S.Editores Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. 2006.p 139-42

89. Launey Y, Nesseler N, Mallédant Y, Seguin P. Clinical review: fever in septic ICU patients--friend or foe? *Crit Care*. 2011; 15(3):222.
90. Hasday JD, Singh IS. Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell Stress Chaperones*. 2000 Nov; 5(5):471-80.
91. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Grupo de Trabajo SDRA Definición. El síndrome de dificultad respiratoria aguda: La definición de Berlín. *JAMA*. 2012; 307:2.526-33
92. Clemmer TP, Fisher CJ Jr, Bone RC, Slotman GJ, Metz CA, Thomas FO. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome *Crit Care Med*. 1992 Oct; 20(10):1395-401.
93. Martin JB, Wheeler AP. Approach to the patient with sepsis. *Clin Chest Med*. 2009 Mar; 30(1):1-16, vii.
94. Michels M, Steckert AV2, Quevedo J3,4, Barichello T5,6, Dal-Pizzol F7. Mechanisms of long-term cognitive dysfunction of sepsis: from blood-borne leukocytes to glial cells. *Intensive Care Med Exp*. 2015 Dec; 3(1):30.
95. Edlich RF, Winters KL, Woodard CR, Britt LD, Long WB 3rd. Massive soft tissue infections: necrotizing fasciitis and purpura fulminans. *J Long Term Eff Med Implants* 2005; 15: 57-65
96. Lerolle N, Carlotti A, Melican K, Aubey F, Pierrot M, Diehl JL, Caille V, Hékimian G, Gandrille S, Mandet C, Bruneval P, Dumenil G, Borgel D. Assessment of the interplay between blood and skin vascular abnormalities in adult purpura fulminans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Sep 15; 188(6):684-92.
97. Melican K, Michea Veloso P, Martin T, Bruneval P, Duménil G. Adhesion of *Neisseria meningitidis* to dermal vessels leads to local vascular damage and purpura in a humanized mouse model. *PLoS Pathog*. 2013 Jan; 9(1):e1003139.
98. Modrykamien AM, Gupta P The acute respiratory distress syndrome. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2015 Apr; 28(2):163-71
99. Koh Y Update in acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care*. 2014 Jan 3; 2(1):2.
100. Pierrakos C, Karanikolas M, Scolletta S, Karamouzou V, Velissaris D. Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options. *J Clin Med Res*. 2012 Feb; 4(1):7-16

101. Bauman ZM, Gassner MY, Coughlin MA, Mahan M, Watras J. Lung Injury Prediction Score Is Useful in Predicting Acute Respiratory Distress Syndrome and Mortality in Surgical Critical Care Patients. *Crit Care Pract.* 2015;2015:157408
102. Mikkelsen ME, Shah CV, Meyer NJ, Gaieski DF, Lyon S, Miltiades AN, Goyal M, Fuchs BD, Bellamy SL, Christie JD. The epidemiology of acute respiratory distress syndrome in patients presenting to the emergency department with severe sepsis *Shock*. 2013 Nov; 40(5):375-81.
103. Holler JG, Bech CN, Henriksen DP, Mikkelsen S, Pedersen C, Lassen AT1. Nontraumatic hypotension and shock in the emergency department and the prehospital setting, prevalence, etiology, and mortality: a systematic review. *PLoS One*. 2015 Mar 19; 10(3):e0119331.
104. Jones AE, Aborn LS, Kline JA .Severity of emergency department hypotension predicts adverse hospital outcome. *Shock*. 2004 Nov;22(5):410-4
105. Gibot S, Lévy B, Nevière R, Cariou A, Lesur O. Myocardial dysfunction and septic shock. *Med Sci (Paris)*. 2004 Dec; 20(12):1115-8.
106. Prabhu MM, Yalakala SK, Shetty R, Thakkar A, Sitapara T. Prognosis of left ventricular systolic dysfunction in septic shock patients *J Clin Diagn Res*. 2015 Mar;9(3):OC05-8
107. Pulido JN, Afessa B, Masaki M, Yuasa T, Gillespie S, Herasevich V, Brown DR, Oh JK. Clinical spectrum, frequency, and significance of myocardial dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Mayo Clin Proc*. 2012 Jul;87(7):620-8
108. Lanspa MJ, Pittman JE, Hirshberg EL, Wilson EL, Olsen T, Brown SM9, Grissom CK. Association of left ventricular longitudinal strain with central venous oxygen saturation and serum lactate in patients with early severe sepsis and septic shock. *Crit Care*. 2015 Aug 31; 19:304.
109. Landesberg G, Gilon D, Meroz Y, Georgieva M, Levin PD, Goodman S, Avidan A, Beerli R, Weissman C, Jaffe AS, Sprung CL Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):895-903.
110. Drosatos K, Lymperopoulos A, Kennel PJ, Pollak N, Schulze PC, Goldberg IJ. Pathophysiology of sepsis-related cardiac dysfunction: driven by inflammation, energy mismanagement, or both? *Curr Heart Fail Rep*. 2015 Apr;12(2):130-40
111. Sato R, Nasu M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy. *J Intensive Care*. 2015 Nov 11; 3:48.

112. Komamura K, Fukui M1, Iwasaku T, Hirotsu S, Masuyama T. Takotsubo cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *World J Cardiol.* 2014 Jul 26; 6(7):602-9.
113. Nef HM, Möllmann H, Kostin S, Troidl C, Voss S, Weber M, Dill T, Rolf A, Brandt R, Hamm CW, Elsässer A. Tako-Tsubo cardiomyopathy: intraindividual structural analysis in the acute phase and after functional recovery. *Eur Heart J.* 2007 Oct; 28(20):2456-64.
114. Chaudhry N, Duggal AK. Sepsis Associated Encephalopathy. *Adv Med.* 2014; 2014:762320.
115. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA.* 2010 Oct 27; 304(16):1787-94.
116. Cotena S, Piazza O. Sepsis-associated encephalopathy. *Transl Med UniSa.* 2012 Jan 18;2:20-7
117. Calvo-Ayala E, Khan B. Delirium management in critically ill patients. *J Symptoms Signs.* 2013; 2(1):23-32.
118. Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med.* 2007 Jun; 33(6):941-50.
119. Annane D Sepsis-associated delirium: the pro and con of C5a blockade. *Crit Care.* 2009;13(2):135
120. Ziaja M. Septic encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013 Oct; 13(10):383.
121. Ziaja M. Sepsis and septic encephalopathy: characteristics and experimental models. *Folia Neuropathol.* 2012; 50(3):231-9.
122. De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur JP, Authier FJ, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, Cerf C, Renaud E, Mesrati F, Carlet J, Raphaël JC, Outin H, Bastuji-Garin S; Groupe de Réflexion et d'Etude des Neuromyopathies en Réanimation. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *JAMA.* 2002 Dec 11;288(22):2859-67.
123. Hermans G, Van den Berghe G3,4. Clinical review: intensive care unit acquired weakness. *Crit Care.* 2015 Aug 5; 19:274.
124. De Jonghe B, Bastuji-Garin S, Sharshar T, Outin H, Brochard L. Does ICU-acquired paresis lengthen weaning from mechanical ventilation? *Intensive Care Med.* 2004 Jun; 30(6):1117-21.

125. Hermans G, Agten A, Testelmans D, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Increased duration of mechanical ventilation is associated with decreased diaphragmatic force: a prospective observational study. *Crit Care*. 2010; 14(4):R127.
126. Schweickert WD, Hall J. ICU-acquired weakness. *Chest*. 2007 May; 131(5):1541-9.
127. Van Mook WN, Hulsewé-Evers RP. Critical illness polyneuropathy. *Curr Opin Crit Care*. 2002 Aug; 8(4):302-10.
128. Lee CM, Fan E. ICU-acquired weakness: what is preventing its rehabilitation in critically ill patients? *BMC Med*. 2012 Oct 3; 10:115.
129. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004; 351: 159-169
130. Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Jun; 22(6):999-1006.
131. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C; Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005 Aug 17; 294(7):813-8.
132. Deleemos AS, Friedman LS. Systemic causes of cholestasis. *Clin Liver Dis*. 2013 May; 17(2):301-17
133. Marshall JC. New translational research provides insights into liver dysfunction in sepsis. *PLoS Med*. 2012; 9(11):e1001341.
134. Nessler N, Launey Y, Aninat C, Morel F, Mallédant Y, Seguin P. Clinical review: The liver in sepsis. *Crit Care*. 2012 Oct 30; 16(5):235.
135. Blasco-Algora S, Masegosa-Ataz J, Gutiérrez-García ML, Alonso-López S, Fernández-Rodríguez CM. Acute-on-chronic liver failure: Pathogenesis, prognostic factors and management. *World J Gastroenterol*. 2015 Nov 14; 21(42):12125-40.
136. Taylor FB, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 2001; 86:1327–1330
137. Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol*. 2009 Apr; 145(1):24-33.

138. Kaneko T, Wada H. Diagnostic criteria and laboratory tests for disseminated intravascular coagulation. *J Clin Exp Hematop*. 2011; 51(2):67-76.
139. Wada H, Matsumoto T2, Yamashita Y3. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J Intensive Care*. 2014 Feb 20; 2(1):15.
140. Perman SM, Goyal M, Gaieski DF. Initial emergency department diagnosis and management of adult patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012 Jun 27; 20:41.
141. Horeczko T, Green JP2, Panacek EA. Epidemiology of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) in the emergency department. *West J Emerg Med*. 2014 May; 15(3):329-36.
142. Liao MM, Lezotte D, Lowenstein SR, Howard K, Finley Z, Feng Z, Byyny RL, Sankoff JD, Douglas IS, Haukoos JS. Sensitivity of systemic inflammatory response syndrome for critical illness among ED patients. *Am J Emerg Med*. 2014 Nov; 32(11):1319-25.
143. Weiss SL, Fitzgerald JC, Maffei FA, Kane JM, Rodriguez-Nunez A, Hsing DD, Franzon D, Kee SY, Bush JL, Roy JA, Thomas NJ, Nadkarni VM; SPROUT Study Investigators and Pediatric Acute Lung Injury and Sepsis Investigators Network. Discordant identification of pediatric severe sepsis by research and clinical definitions in the SPROUT international point prevalence study. *Crit Care*. 2015 Sep 16; 19:325.
144. Kruse O, Grunnet N, Barfod C. Blood lactate as a predictor for in-hospital mortality in patients admitted acutely to hospital: a systematic review. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2011 Dec 28; 19:74.
145. Jones AE. Lactate clearance for assessing response to resuscitation in severe sepsis. *Acad Emerg Med*. 2013 Aug; 20(8):844-7.
146. Hohn A, Schroeder S, Gehrt A, Bernhardt K, Bein B, Wegscheider K, Hochreiter M. Procalcitonin-guided algorithm to reduce length of antibiotic therapy in patients with severe sepsis and septic shock. *BMC Infect Dis*. 2013 Apr 1; 13:158.
147. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*. 2006 Jul; 34(7):1996-2003. HHH
148. Faix JD Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013 Jan-Feb; 50(1):23-36.

149. Samraj RS, Zingarelli B, Wong HR. Role of biomarkers in sepsis care. *Shock*. 2013 Nov; 40(5):358-65.
150. Muñoz Colmenero A. Rincón de Pablo. L, Nieto Sandoval. **P**, de la Sierra M Sáenz Mateos. L, Buces González. E, Morales Elipe V. Marcadores de sepsis: Situación actual. *Apuntes de Ciencia* 16.05.2014. 1:13
151. Cho SY, Choi JH “Biomarkers of Sepsis. *Infection & Chemotherapy* 46.1 (2014): 1–12.
152. Terpstra ML, Aman J, van Nieuw Amerongen GP, Groeneveld AB. Plasma biomarkers for acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*. 2014; 42.
153. León. C, Loza. A Biomarcadores en la sepsis. ¿Simplificando lo complejo? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(3):137–139
154. Andreu LM, Alonso-Tarrés C, Echevarría Mayo JM. “Diagnóstico de las enfermedades infecciosas” en Ausina V; Moreno S. “Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica”; Ed panamericana 2005; cp 4:53-70.
155. Millar JM, Colmes HT, Krisher K. “General principles of specimen collection and handling” in Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, et al. “Manual of Clinical Microbiology”. 8th Ed. ASM press. 2003; chp 6:55-66.
156. Loza Fernández de Bobadilla E, Planes Reig A, Rodríguez Creixems M. 3a. Hemocultivos 2003. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>
157. Peters, R.P. van Agtmael, M.A. Danner, S.A., Savelkoul, P.H. and Vandenbrouche-Grauls, C.M. (2004). New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 4, 751-760
158. Struelens MJ. Detection of microbial DNAemia: does it matter for sepsis management? *Intensive Care Med*. 2010 Feb; 36(2):193-5.
159. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoelt A, Stüber F. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol*. 2008 Sep; 197(3):313-24.

160. Dark PM, Dean P, Warhurst G. Bench-to-bedside review: the promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. *Crit Care*. 2009;13(4):217.
161. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med*. 2008 May; 36(5):1487-92.
162. Cuenca-Estrella M Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012 May; 30(5):257-64.
163. Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU Comparative evaluation of (1, 3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infect Dis*. 2007 Sep 4; 7:103.
164. Bergeron A, Porcher R, Menotti J, Poirot JL, Chagnon K, Vekhoff A, Cornet M, Isnard F, Raffoux E, Brethon B, Lacroix C, Touratier S, Latgé JP, Bouges-Michel C, Tazi A, Derouin F, Ribaud P, Sulahian A. Prospective evaluation of clinical and biological markers to predict the outcome of invasive pulmonary aspergillosis in hematological patients. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar; 50(3):823-30.
165. Levesque E, El Anbassi S, Sitterle E, Foulet F, Merle JC, Botterel F. Contribution of (1,3)-beta-D-glucan to diagnosis of invasive candidiasis after liver transplantation. *J Clin Microbiol*. 2015 Mar; 53 (3):771-6.
166. Han SB, Kim SK, Lee JW, Yoon JS, Chung NG, Cho B, Jeong DC, Kang JH, Kim HK, Lee DG, Lee HS, Im SA. Serum galactomannan index for early prediction of mortality in immunocompromised children with invasive pulmonary aspergillosis. *BMC Infect Dis*. 2015 Jul 14;15: 271.
167. Neofytos D, Railkar R, Mullane KM, Fredricks DN, Granwehr B, Marr KA, Almyroudis NG, Kontoyiannis DP, Maertens J, Fox R, Douglas C, Iannone R2, Kauh E2, Shire N. Correlation between Circulating Fungal Biomarkers and Clinical Outcome in Invasive Aspergillosis *PLoS One*. 2015 Jun 24; 10(6):e0129022.
168. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O; Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3) *Clin Infect Dis*. 2012 Mar 1;54(5):633-43.

169. He S, Hang JP, Zhang L, Wang F, Zhang DC, Gong FH. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015 Aug; 48(4):351-61.
170. White PL, Wingard JR, Bretagne S, Löffler J, Patterson TF, Slavin MA, Barnes RA, Pappas PG, Donnelly JP. Aspergillus Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing. *Clin Infect Dis.* 2015 Oct 15;61(8):1293-303
171. Cuenca-Estrella M, Bassetti M, Lass-Flörl C, Rácil Z, Richardson M, Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jan; 66 Suppl 1:i15-24.
172. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Caliendo AM1, Mylonakis E. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol.* 2014 Oct; 52(10):3731-42.
173. Springer J, Morton CO, Perry M, Heinz WJ, Paholcsek M, Alzheimer M, Rogers TR, Barnes RA, Einsele H, Loeffler J, White PL. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of Aspergillus DNA in high-risk hematological patients *J Clin Microbiol.* 2013 May; 51(5):1445-50.
174. Paholcsek M, Fidler G, Konya J, Rejto L, Mehes G, Bukta E, Loeffler J, Biro S. Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia. *BMC Infect Dis.* 2015 Jul 1;15:251.
175. Rodicio Mdel R, Mendoza Mdel C. [Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004 Apr; 22(4):238-45.
176. Turenne CY, Witwicki E, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb;38(2):513-20.ç
177. Mancini N, Clerici D, Diotti R, Perotti M, Ghidoli N, De Marco D, Pizzorno B, Emrich T, Burioni R, Ciceri F, Clementi M. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol.* 2008 May; 57 (Pt 5):601-4.

178. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, Stüber F. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol*. 2008 Sep; 197(3):313-24.
179. Costa J. [Real-time PCR]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 May;22(5):299-304;
180. Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2014 Mar;4(1):1-25.
181. Vilar J, Domingo ML, Soto C, Cogollos J. Radiology of bacterial pneumonia. *Eur J Radiol*. 2004 Aug; 51(2):102-13.
182. Erdem H, Kocak-Tufan Z1, Yilmaz O, Karakurt Z, Cilli A, Turkan H, Yazicioglu-Mocin O, Adiguzel N, Gungor G, Taşcı C, Yilmaz G, Oncul O, Dogan-Celik A, Erdemli O, Oztoprak N, Tomak Y, Inan A, Tok D, Temur S, Oksuz H, Senturk O, Buyukkocak U, Yilmaz-Karadag F, Ozturk-Engin D, Ozcengiz D, Karakas A, Bilgic H, Leblebicioglu H. The interrelations of radiologic findings and mechanical ventilation in community acquired pneumonia patients admitted to the intensive care unit: a multicentre retrospective study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014 Jan 8; 13:5.
183. Vieillard-Barón A. Septic cardiomyopathy séptico cardiomiopatía. *Anales de Cuidados Intensivos*. 2011;1:6.
184. Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, Laming AS, Sejvar J, Bitnun A, Stahl JP, Mailles A, Drebot M, Rupprecht CE, Yoder J, Cope JR, Wilson MR, Whitley RJ, Sullivan J, Granerod J, Jones C, Eastwood K, Ward KN, Durrheim DN, Solbrig MV, Guo-Dong L, Glaser CA; International Encephalitis Consortium .Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. *Clin Infect Dis*. 2013 Oct; 57(8):1114-28.
185. Becerra Nakayo EM, García Vicente AM, Soriano Castrejón AM, Mendoza Narváez JA, Talavera Rubio MP, Poblete García VM, Cordero García JM. [Analysis of cost-effectiveness in the diagnosis of fever of unknown origin and the role of (18)F-FDG PET-CT: a proposal of diagnostic algorithm .*Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2012 Jul-Aug;31(4):178-86.
186. Vera Carrasco O..Protocolo Diagnóstico Terapéutico de la Sepsis y Shock Séptico. *Rev Med La Paz*, 2010; 16(1): 45-52
187. Hernández Belmontea. A e Tárraga Rodríguez .I. Protocolo diagnóstico y tratamiento del paciente en shock en Urgencias Medicine. 2007;9(88):5715-5717

188. Werner-Busse A, Zuberbier T, Worm M. The allergic emergency--management of severe allergic reactions. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014 May;12(5):379-87;
189. Dabar G, Harmouche C, Habr B, Riachi M, Jaber B. Shoshin Beriberi in Critically-Ill patients: case series. *Nutr J.* 2015 May 17; 14:51.
190. Møller S, Henriksen JH, Bendtsen F. Extrahepatic complications to cirrhosis and portal hypertension: haemodynamic and homeostatic aspects. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 14; 20(42):15499-517.
191. Rico Cepeda P, Palencia Herrejón E, Rodríguez Aguirregabiria MM. [Kounis syndrome]. *Med Intensiva.* 2012 Jun-Jul; 36(5):358-64.
192. Boyer EW. Management of opioid analgesic overdose *N Engl J Med.* 2012 Jul 12;367(2):146-55
193. Val-Flores LS, Fior A, Santos A, Reis L, Bento L. A rare case of distributive shock. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2014 Oct-Dec; 26(4):416-20.
194. Druey KM, Greipp PR. Narrative review: the systemic capillary leak syndrome. *Ann Intern Med.* 2010 Jul 20; 153(2):90-8.
195. Piacentini E, Ferrer R. [Severe sepsis and septic shock: everything done, everything to be done]. *Med Intensiva.* 2012 May; 36(4):245-6.
196. Palencia Herrejón E1, Bueno García B. New clinical practice guidelines of the surviving sepsis campaign: a critical appraisal. *Med Intensiva.* 2013 Dec; 37(9):600-4.
197. Finfer S1, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, Norton R; SAFE Study Investigators. A comparison of albumin and saline for fluidresuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med.* 2004 May 27; 350(22):2247-56.
198. Xu JY, Chen QH, Xie JF, Pan C, Liu SQ, Huang LW, Yang CS, Liu L, Huang YZ, Guo FM10, Yang Y, Qiu HB. Comparison of the effects of albumin and crystalloid on mortality in adult patients with severe sepsis and septic shock: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Crit Care.* 2014 Dec 15; 18(6):702.
199. Perel P, Roberts I, Ker K. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Feb 28; 2:CD000567.
200. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005; 9 Suppl 4:S13-9.
201. Ince C. Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation *Crit Care.* 2015; 19 Suppl 3:S8.

202. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*. 2006 Nov 23; 355(21):2267.
203. Gauer RL. Early recognition and management of sepsis in adults: the first six hours. *Am Fam Physician*. 2013 Jul 1; 88(1):44-53.
204. De Backer D, Biston P, Devriendt J, et al. Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N Engl J Med*. 2010; 362: 779–789
205. Russell JA, Walley KR, Singer J, Gordon AC, Hébert PC, Cooper DJ, Holmes CL, Mehta S, Granton JT, Storms MM, Cook DJ, Presneill JJ, Ayers D; VASST Investigators. Vasopressin versus norepinephrine infusion in patients with septic shock. *N Engl J Med*. 2011; 363: 1171–1177.
206. Avni T, Lador A, Lev S, Leibovici L, Paul M, Grossman A. Vasopressors for the Treatment of Septic Shock: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Aug 3; 10(8):e0129305
207. Zhou F, Mao Z, Zeng X, Kang H, Liu H, Pan L, Hou PC. Vasopressors in septic shock: a systematic review and network meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag*. 2015 Jul 14; 11:1047-59.
208. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar A, Simon D, Peters C, Ahsan M, Chateau D; Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*. 2009 Nov; 136(5):1237-48.
209. Lee YT, Kuo SC, Yang SP, Lin YT, Tseng FC, Chen TL, Fung CP. Impact of appropriate antimicrobial therapy on mortality associated with *Acinetobacter baumannii* bacteremia: relation to severity of infection. *Clin Infect Dis*. 2012 Jul; 55(2):209-15.
210. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, Artigas A, Schorr C, Levy MM. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med*. 2014 Aug; 42(8):1749-55.
211. Garnacho-Montero J, Gutiérrez-Pizarra A, Escoreca-Ortega A, Corcia-Palomo Y, Fernández-Delgado E, Herrera-Melero I, Ortiz-Leyba C, Márquez-Vácara JA. De-escalation of empirical therapy is associated with lower mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*. 2014 Jan; 40(1):32-40.
212. Joung MK, Lee JA, Moon SY, Cheong HS, Joo EJ, Ha YE, Sohn KM, Chung SM, Suh GY, Chung DR, Song JH, Peck KR. Impact of de-escalation therapy on clinical outcomes for intensive care unit-acquired pneumonia. *Crit Care*. 2011; 15(2):R79.

213. Paskovaty A, Pastores SM, Gedrimaite Z, Kostecky N, Riedel ER, Seo SK. Antimicrobial de-escalation in septic cancer patients: is it safe to back down? *Intensive Care Med.* 2015 Nov; 41(11):2022-3.
214. Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, Keh D, Briegel J, Beishuizen A, Dimopoulou I, Tsagarakis S, Singer M, Chrousos GP, Zaloga G, Bokhari F, Vogeser M; American College of Critical Care Medicine. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med.* 2008 Jun; 36(6):1937-49.
215. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for treating sepsis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Dec 4; 12 :CD002243.
216. Song F, Zhong LJ, Han L, Xie GH, Xiao C, Zhao B, Hu YQ, Wang SY, Qin CJ, Zhang Y, Lai DM, Cui P, Fang XM. Intensive insulin therapy for septic patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:698265.
217. Leelarathna L, English SW, Thabit H, Caldwell K, Allen JM, Kumareswaran K, Wilinska ME, Nodale M, Mangat J, Evans ML, Burnstein R, Hovorka R. Feasibility of fully automated closed-loop glucose control using continuous subcutaneous glucose measurements in critical illness: a randomized controlled trial. *Crit Care.* 2013 Jul 24; 17(4):R159.
218. Boom DT, Sechterberger MK, Rijkenberg S, Kreder S, Bosman RJ, Wester JP, van Stijn I, DeVries JH, van der Voort PH. Insulin treatment guided by subcutaneous continuous glucose monitoring compared to frequent point-of-care measurement in critically ill patients: a randomized controlled trial *Crit Care.* 2014 Aug 20; 18(4):453.
219. Miller RR III, Dong L, Nelson NC, et al. Multicenter implementation of a severe sepsis and septic shock treatment bundle. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 188(1):77-82.
220. Fuller BM, Mohr NM, Dettmer M, Kennedy S, Cullison K, Bavolek R, Rathert N, McCammon C. Mechanical ventilation and acute lung injury in emergency department patients with severe sepsis and septic shock: an observational study. *Acad Emerg Med.* 2013 Jul; 20(7):659-69.
221. Ginde AA, Moss M. Lung-protective ventilation in emergency department patients with severe sepsis. *Acad Emerg Med.* 2014 Jan; 21(1):96-7.
222. Hall SR, Tsoyi K, Ith B, Padera RF Jr, Lederer JA, Wang Z, Liu X, Perrella MA. Mesenchymal stromal cells improve survival during sepsis in the absence of heme oxygenase-1: the importance of neutrophils *Stem Cells.* 2013 Feb; 31(2):397-407.

-
223. Chao YH, Wu HP, Wu KH, Tsai YG, Peng CT, Lin KC, Chao WR, Lee MS, Fu YC. An increase in CD3+CD4+CD25+ regulatory T cells after administration of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during sepsis. *PLoS One*. 2014 Oct 22; 9(10):e110338.
224. Zhou F, Peng Z, Murugan R, Kellum JA. Blood purification and mortality in sepsis: a meta-analysis of randomized trials. *Crit Care Med*. 2013 Sep;41(9):2209-20.
225. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, de Cal M, Polanco N, Corradi V, Lentini P, Nalesso F, Ueno T, Ranieri VM, Ronco C. Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care*. 2007; 11(2):R47.
226. Payen DM, Guilhot J, Launey Y, Lukaszewicz AC, Kaaki M, Veber B, Pottecher J, Joannes-Boyau O, Martin-Lefevre L, Jabaudon M, Mimoz O, Coudroy R, Ferrandière M, Kipnis E, Vela C, Chevallier S, Mallat J, Robert R; ABDOMIX Group. Early use of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock due to peritonitis: a multicenter randomized control trial. *Intensive Care Med*. 2015 Jun;41(6):975-84.
227. Norrby-Teglund A, Haque KN, Hammarström L. Intravenous polyclonal IgM-enriched immunoglobulin therapy in sepsis: a review of clinical efficacy in relation to microbiological aetiology and severity of sepsis. *J Intern Med*. 2006 Dec; 260(6):509-16.
228. Fink T, Glas M, Wolf A, Kleber A, Reus E, Wolff M, Kiefer D, Wolf B, Rensing H, Volk T, Mathes AM. Melatonin receptors mediate improvements of survival in a model of polymicrobial sepsis. *Crit Care Med*. 2014 Jan; 42(1):e22-31.
229. Toner P, McAuley DF, Shyamsundar M. Aspirin as a potential treatment in sepsis or acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2015 Oct 23; 19:374.
230. Martin-Loeches I, Levy MM, Artigas A. Management of severe sepsis: advances, challenges, and current status. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Apr 9; 9:2079-88. Aspirin as a potential treatment in sepsis or acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2015 Oct 23; 19:374.
231. Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, Tsukasaki K, Kohno S, Seki M, Sugimoto H, Shimazu T, Tasaki O, Matsushima A, Ikeda Y, Okamoto S, Aikawa N, Hori S, Obara H, Ishizaka A, Hasegawa N, Takeda J, Kamihira S, Sugahara K, Asari S, Murata M, Kobayashi Y, Ginba H, Sumiyama Y, Kitajima M. Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Crit Care*. 2010; 14(4):R159.

232. Störmer M, Kleesiek K, Dreier J. High-volume extraction of nucleic acids by magnetic bead technology for ultrasensitive detection of bacteria in blood components. *Clinical Chemistry*. 2007; 53:1 104–110.
233. StevensMP, Rudland E, Garland SM, Tabrizi SN. Assessment of MagNApure LC extraction system for detection of human papillomavirus (HPV) DNA in PreservCy tsamples by the Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY HPV tests *J Clin Microbiol*. 2006 Jul; 44(7):2428-33.
234. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*. 2009; 2009:574398.
235. Knepp JH, Geahr MA, Forman MS, Valsamakis A. Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug; 41(8):3532-6.
236. Informe ENVIN 2014 <http://hws.vhebron.net/envin-helics/index.asp>.
237. ESTUDIO EPINE-EPPS 2015 epine@vhebron.net.
238. Espy MJ, Rys PN, Wold AD, Uhl JR, Sloan LM, Jenkins GD, Ilstrup DM, Cockerill FR 3rd, Patel R, Rosenblatt JE, Smith TF. Detection of herpes simplex virus DNA in genital and dermal specimens by LightCycler PCR after extraction using the IsoQuick, MagNAPure, and BioRobot9604methods. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun; 39(6):2233-6.
239. Costa, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004 Mayo 22(5), 299-305.
240. Lee CC, Lin WJ, Shih HI, Wu CJ, Chen PL, Lee HC, Lee NY, Chang CM, Wang LR, Ko WC. Clinical significance of potential contaminants in bloodcultures among patients in a medical center *J Microbiol Immunol Infect*. 2007 Oct; 40(5):438-44.
241. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, Stüber F. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol*. 2008 Sep; 197(3):313-24.
242. Gibot S1, Cariou A, Drouet L, Rossignol M, Ripoll L. Association between a genomic polymorphism within the CD14locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med*. 2002 May; 30(5):969-73.

-
243. Zhang AQ, Yue CL, Gu W, Du J, Wang HY, Jiang J Association between CD14 promoter -159C/T polymorphism and the risk of sepsis and mortality: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Aug 19; 8(8):e71237.
244. Unkelbach K, Gardemann A, Kostrzewa M, Philipp M, Tillmanns H, Haberbosch W. A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Apr; 19(4):932-8.
245. Heesen M, Kunz D, Rossaint R, Blömeke B. Real-timePCRassay with fluorescent hybridization probes for rapid genotyping of the CD14promotorpolymorphism. *Clin Chem*. 2000 Nov; 46(11):1866-7.
246. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A polymorphism* in the 5_ flanking region of the CD14 geneis associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:976–9
247. Lang S, Watkin RW, Lambert PA, Littler WA, Elliott TS. Detection of bacterial DNA in cardiac vegetations by PCR after the completion of antimicrobial treatment for endocarditis *Clin Microbiol Infect*. 2004 Jun;10(6):579-81
248. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG Jr, Ryan T, Bashore T, Corey GR. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000 Apr; 30(4):633-8.
249. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17; 348(16):1546-54.
250. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*. 2006 Oct 19; 355(16):1699-713.
251. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloods tream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest*. 2000 Jul; 118(1):146-55.
252. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Herrera-Melero I, Aldabo-Pallás T, Cayuela-Dominguez A, et al. Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU with sepsis: a matched cohort study. *J Antimicrob Chemother* 61: 436–441. (2008)
253. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ Inadequate antimicrobial treatment of infections. *Chest* 115(2): 462–474. (1999)

254. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, et al. (2003) Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis *Am J Medicine* 115: 529–535.
255. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim van Dillen, and J. Van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495–503.
256. Drummond MF, O'Brien B, Stoddart GL, Torrance GW Cost analysis. In Drummond MF ed, *Methods for the economic evaluation of health care programmes* Oxford. Oxford University Press 1997. pp 52-95.
257. Briggs AH, Wonderling DE, Mooney CZ. Pulling cost-effectiveness analysis up by its bootstraps: a non-parametric approach to confidence interval estimation *Health Econ* 1997; 6:327-40.
258. Pemán J. Diagnóstico de la aspergilosis invasiva. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: S90-S92
259. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008 Jun 15; 46(12):1813-21.
260. Breitkopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis *Circulation.* 2005;111:1415-21
261. Kotilainen P, Heiro M, Jalava J, Rantakokko V, Nikoskelainen J, Nikkari S, Rantakokko-Jalava K. A etiological diagnosis of infective endocarditis by direct amplification of rRNA genes from surgically removed valve tissue. *Ann Med.* 2006; 38(4):263-73.
262. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, Bouza E; Group for the Management of Infective Endocarditis of the Gregorio Marañón Hospital. Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase Chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine.* 2007; 86:195-202.

263. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, de Jesus Antunes M, Thilen U, Lekakis J, Lengyel M, Müller L, Naber CK, Nihoyannopoulos P, Moritz A, Zamorano JL; ESC Committee for Practice Guidelines. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2009 Oct; 30(19):2369-413.
264. Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, Jalal H, Foot AB, Millar MR. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16Sr RNA gene amplification by polymerase chainreaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998 Apr;17(4):247-53
265. Peters RP, Mohammadi T, Vandenbroucke-Grauls CM, Danner SA, van Agtmael MA, Savelkoul PH. Detection of bacterial DNA in blood samples from febrile patients: under estimate infection or emerging contamination? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004 Oct 1; 42(2):249-53.
266. Ammann RA, Zucol F, Aebi C, Niggli FK, Kühne T, Nadal D. A prospective pilot study in pediatric cancer patients with fever and neutropenia. *Support Care Cancer*. 2007 Jun; 15(6):637-41.
267. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Book M, Gebel J, Hoeft A, Stuber F. Detection and differentiation of in vitro-spiked bacteria by real-time PCR and melting-curve analysis. *J Clin Microbiol*. 2004 Feb; 42(2):512-7.
268. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L. Evaluation of the Hyplex Blood Screen Multiplex PCR-Enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul; 42(7):3147-52.
269. Meier A, Persing DH, Finken M, Böttger EC. Elimination of contaminating DNA within polymerase chainreaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J Clin Microbiol*. 1993 Mar; 31(3):646-52.
270. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S Rna PCR. *J Clin Microbiol*. 2000 May; 38(5):1747-52.
271. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Hoeft A, Stuber F. Comparison of different decontamination methods for reagents to detect low concentrations of bacterial 16S DNA by real-time-PCR. *Mol Biotechnol*. 2002 Nov; 22(3):231-42.

272. Lee CC, Lin WJ, Shih HI, Wu CJ, Chen PL, Lee HC, Lee NY, Chang CM, Wang LR, Ko WC. Clinical significance of potential contaminants in blood cultures among patients in a medical center. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007 Oct; 40(5):438-44.
273. Gürtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23Sr DNA spacer region. *Microbiology.* 1996 Jan; 142 (Pt 1):3-16.
274. Barry T, Colleran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1991 Aug;1(1):51-6
275. Lehmann, L. E., K. P. Hunfeld, T. Emrich, G. Haberhausen, H. Wissing, A. Hoeft, and F. Stuber. 2008. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:313–324.
276. Werner AS, Cobbs CG, Kaye D, Hook EW. Studies on the bacteremia of bacterial endocarditis *JAMA.* 1967 Oct 16; 202(3):199-203.
277. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med.* 1980 Mar; 68(3):332-43.
278. Von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, Purr I, Cook G, Hoeft A, Glasmacher A, Stüber F. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2009 Aug; 47(8):2405-10.
279. Häcker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med.* 2000 Aug 21; 192(4):595-600.
280. Störmer M, Kleesiek K, Dreier J. High-volume extraction of nucleic acids by magnetic bead technology for ultra sensitive detection of bacteria in blood components. *Clin Chem.* 2007 Jan; 53(1):104-10.
281. Alvarez M., Carlos S., Peña A., Chueca N., Torres M., Pérez-López J.A., Piedrola G., Maroto M.C., García F. Automated DNA extraction with the easyMAG prior to molecular investigation of blood-borne bacteria and fungi with SeptiFast. Granada ES. Abstr. 18 th ECCMID 26 th ICC2008 Barcelona P1969 CMI ed Wiley-Blackwell pag S578

-
282. Regueiro B, Varela E, Martinez-Lamas L, Santos A, Alvarez J (2008)Automation of SeptiFast for molecular diagnosis of septic patients.Abstr Sepsis 2008 Granada Critical Care 12 Suppl 5-P12, S5-6.
283. Uh JR, Adamson SC, Vetter EA, Schleck CD, Harmsen WS, Iverson LK, Santrach PJ, Henry NK, Cockerill FR. Comparison of LightCycler PCR, rapid antigen immunoassay, and culture for detection of group A streptococci from throat swabs.
284. Morata P, Queipo-Ortuño MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 1998 Sep;36(9):2443-6
285. Regueiro BJ, Varela-Ledo E, Martinez-Lamas L, Rodriguez-Calviño J, Aguilera A, Santos A, Gomez-Tato A, Alvarez-Escudero J. Automated extraction improves multiplex molecular detection of infection in septicpatients. *PLoS One.* 2010 Oct 13;5(10):e13387
286. Boom R, Sol C, Beld M, Weel J, Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P. Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective inding of bovine alpha-casein to silica particles. *J Clin Microbiol.* 1999 Mar; 37(3):615-9.
287. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM; Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004 Mar; 32(3):858-73. 2004 Jun;32(6):1448
288. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb; 39(2):485-93.
289. Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan; 38(1):345-50.
290. Abu Al-Soud W, Rådström P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol.* 2000 Dec; 38(12):4463-70.
291. Célar d M, Tristan A, Boisset S, Vandenesch F. [New microbiologic diagnostic techniques in infective endocarditis].*Ann Cardiol Angeiol (Paris).* 2008 Apr;57(2):78-80.

292. Vince A, Lepej SZ, Barsić B, Dusek D, Mitrović Z, Serventi-Seiwerth R, Labar B. LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J Med Microbiol*. 2008 Oct;57(Pt 10):1306-7
293. Mussap M, Molinari MP, Senno E, Gritti P, Soro B, Mannelli S, Fabris C. New diagnostic tools for neonatal sepsis: the role of a real-time polymerase chain reaction for the early detection and identification of bacterial and fungal species in blood samples. *J Chemother*. 2007 Oct;19 Suppl 2:31-4.
294. Lehmann LE, Alvarez J, Hunfeld KP, Goglio A, Kost GJ, Louie RF, Raglio A, Regueiro BJ, Wissing H, Stüber F et al Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Critical Care Medicine*. 2009; 37:12:3085–3090.
295. Casalta JP, Gouriet F, Roux V, Thuny F, Habib G, Raoult D. Evaluation of the LightCycler SeptiFast test in the rapid etiologic diagnosis of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Jun;28(6):569-73
296. Ratzinger F, Tsirkinidou I2, Haslacher H1, Perkmann T1, Schmetterer KG1, Mitteregger D3, Makristathis A3, Burgmann H2. Evaluation of the Septifast MGrade Test on Standard Care Wards-A Cohort Study. *PLoS One*. 2016 Mar 17;11(3):e0151108.
297. MacLaren R, Bond CA, Martin SJ, Fike D. Clinical and economic outcomes of involving pharmacists in the direct care of critically ill patients with infections. *Crit Care Med*. 2008 Dec; 36(12):3184-9.
298. Sacristán JA, Prieto L, Huete T, Artigas A, Badia X, Chinn C, Hudson P. [Cost-effectiveness of drotrecogin alpha [activated] in the treatment of severe sepsis in Spain]. *Gac Sanit*. 2004 Jan-Feb; 18(1):50-7.
299. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*. 1999 Feb; 115(2):462-74.
300. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. appropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis *Am J Med*. 2003 Nov;115(7):529-35.
301. Schramm GE, Johnson JA, Doherty JA, Micek ST, Kollef MH Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sterile-site infection: The importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Crit Care Med*. 2006 Aug; 34(8):2069-74.

302. Leone M, Martin C. How to break the vicious circle of antibiotic resistances? *Curr Opin Crit Care*. 2008 Oct;14(5):587-92
303. Eagye KJ, Nicolau DP, Lockhart SR, Quinn JP, Doern GV, Gallagher G, Abramson MA. A pharmacodynamic analysis of resistance trends in pathogens from patients with infection in intensive care units in the United States between 1993 and 2004. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007 Oct 1; 6:11.
304. Zhang G, Khoo SK, Laatikainen T, Pekkarinen P, Vartiainen E, von Hertzen L, Hayden CM, Goldblatt J, Mäkelä M, Haahtela T, Le Souëf PN. Opposite gene by environment interactions in Karelia for CD14 and CC16 single nucleotide polymorphisms and allergy. *Allergy*. 2009 Sep; 64(9):1333-41.
305. Fernández AL, Varela E, Martínez L, Martínez A, Sierra J, González-Juanatey J R, Regueiro B. Evaluación de una PCR multiplex en tiempo real para la detección de patógenos en el tejido valvular en pacientes con Endocarditis *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(10):1205-8
306. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, Bouza E; Group for the Management of Infective Endocarditis of the Gregorio Marañón Hospital. Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine (Baltimore)*. 2007 Jul;86(4):195-202
307. Voldstedlund M, Nørum Pedersen L, Baandrup U, Klaaborg KE, Fuursted K Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. *APMIS*. 2008 Mar; 116(3):190-8.
308. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG Jr, Ryan T, Bashore T, Corey GR. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000 Apr; 30(4):633-8.
309. Westh H, Lisby G, Breysse F, Bøddinghaus B, Chomarat M, Gant V, Goglio A, Raglio A, Schuster H, Stuber F, Wissing H, Hoeft A. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of blood stream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jun; 15(6):544-51.
310. Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, et al. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol*. 2009; 47:2405-10.

311. Rovey C, Greub G, Lepidi H, Casalta JP, Habib G, Collart F, Raoult D. PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan; 43(1):163-7.
312. Hotchkiss RS, Monneret G, inmunosupresión inducida por sepsis Payen D.: de disfunciones celulares a la inmunoterapia. *Nat Rev Immunol.* 2013 Dec; 13 (12): 862-874.
313. Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP, Kost G Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2014 Mar; 4(1):1-25.
314. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, Menichella D. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol.* 2011 Jun; 49(6):2252–2258.
315. Rak M, Barlič-Maganja D, Kavčič M, Trebše R, Cör A. Comparison of molecular and culture method in diagnosis of prosthetic joint infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2013 Jun; 343(1):42-8.
316. Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H2, Saeki H, Katano H. Development of a new real-time PCR system for simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Nov 1;8(11):15479-88.